

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"
FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI



DOTTORATO IN SCIENZE CHIMICHE XX CICLO
2004-2007

SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI ANALOGHI DI DNA

Tutore: *Ch.mo Prof. Carlo Pedone*

Dottoranda: *Soccorsa Pensato*

Coordinatore: *Ch.mo Prof. Aldo Vitagliano*

Relatore: *Ch.mo Prof. Livio Paolillo*

Indice

Abbreviazioni	4
Capitolo 1.....	6
<u>Introduzione generale</u>.....	6
1.1. Oligonucleotidi di sintesi come strumento per la regolazione genica.....	6
1.2. PNA: struttura e proprietà.....	12
1.2.1. Proprietà chimico-fisiche.....	12
1.2.2. Strutture tridimensionali di complessi di PNA.....	19
1.3. PNA: applicazioni.....	22
1.3.1. Applicazioni terapeutiche.....	23
1.3.2. Applicazioni in biologia molecolare.....	27
1.3.3. Applicazioni in diagnostica.....	28
1.4. Delivery di PNA.....	30
1.4.1. Delivery di PNA nel compartimento cellulare.....	30
1.4.2. Delivery di PNA nel compartimento nucleare.....	34
<u>Obiettivi del lavoro di tesi</u>.....	38
<u>Bibliografia</u>.....	39
Capitolo 2.....	46
2.1. Sintesi e caratterizzazione di PNA per il targeting di geni di interesse biologico.....	46
2.1.a. Gene β -globina.....	52
2.1.b. Gene TrKAIII.....	77
2.2. Conclusioni.....	85
2.3. Parte sperimentale.....	89
2.4. Bibliografia.....	97

Capitolo 3	99
3.1. Sintesi di monomeri di PNA modificati.....	99
3.1.a. Sintesi e caratterizzazione di un monomero di PNA derivatizzato sulla posizione γ dello scheletro pseudopeptidico con un gruppo mercaptometile.....	110
3.1.b. Sintesi e caratterizzazione di un monomero di PNA derivatizzato sulla posizione γ dello scheletro pseudopeptidico con un gruppo idrossimetile.....	117
3.2. Conclusioni.....	126
3.3. Parte sperimentale.....	129
3.4. Bibliografia.....	141
<u>Summary</u>	145

Abbreviazioni

A	Adenina
Bhoc	Benzidrilossicarbonile
BIA	Biomolecular Interactions Assay
Bn	Benzile
Boc	terz-Butossicarbonile
C	Citosina
CD	Dicroismo Circolare
Cys	L-Cisteina
DCM	Diclorometano
DIEA	N,N-Diisopropiletilammina
DMAP	4-Dimetilamminipiridina
DMF	N,N-Dimetilformammide
DMSO	Dimetilsolfossido
DNA	Acido deossiribonucleico
EDC	N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etil- carbodiimmideidrocloreuro
ESI	Ionizzazione elettrospray
Fmoc	9-Fluorenilmetossicarbonile
G	Guanina
HATU	2-(7-Azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato
HBTU	2-(Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato
HOBt	1-Idrossibenzotriazolo

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
Maldi-Tof	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight
Me	Metile
NCL	Native chemical ligation
NMR	Risonanza Magnetica Nucleare
ODN	Oligodeossinucleotide
PDA	Photodiode Array
Ph	Fenile
PNA	Acido Peptido Nucleico
ppm	Parti per milioni
PS	Polistirene
RNA	Acido ribonucleico
RNasi	Ribonucleasi
Ser	L-Serina
SPR	Risonanza plasmonica di superficie
T	Timina
TEA	Trietilammina
TFA	Acido Trifluoroacetico
THF	Tetraidrofurano
TIS	Triisopropilsilano
TLC	Thin layer chromatography (cromatografia su strato sottile)
T_m	Temperatura di fusione

CAPITOLO 1

Introduzione generale

1.1. Oligonucleotidi di sintesi come strumento per la regolazione genica

La ricerca di nuove molecole capaci di interagire selettivamente ed in maniera stabile con il DNA o l'RNA è un settore di grande interesse per le possibili applicazioni nel campo della protezione della salute umana. Gli acidi nucleici, infatti, giocano un ruolo centrale in tutti i processi cellulari in quanto trasportatori dell'informazione genetica.

L'espressione di un gene è fondamentalmente un processo a due stadi (fig. 1A): nella prima fase, la trascrizione di un doppio filamento di DNA dà origine a molte copie di RNA messaggero (mRNA); nella seconda fase, dopo il trasferimento dal nucleo al citoplasma, l'mRNA è tradotto in un gran numero di proteine. L'intero processo è normalmente controllato dall'azione di proteine che si vanno a legare al DNA o all'RNA, note come attivatori e repressori. E' possibile interferire nei processi di trascrizione (approccio antigene) e traduzione (approccio antisense) utilizzando molecole di natura sintetica (fig. 1B). I primi scienziati a proporre che oligodeossinucleotidi

(ODNs) antisenso di sintesi potevano essere applicati alla regolazione dell'espressione genica furono Zamecnik e Stephenson nel 1978.¹

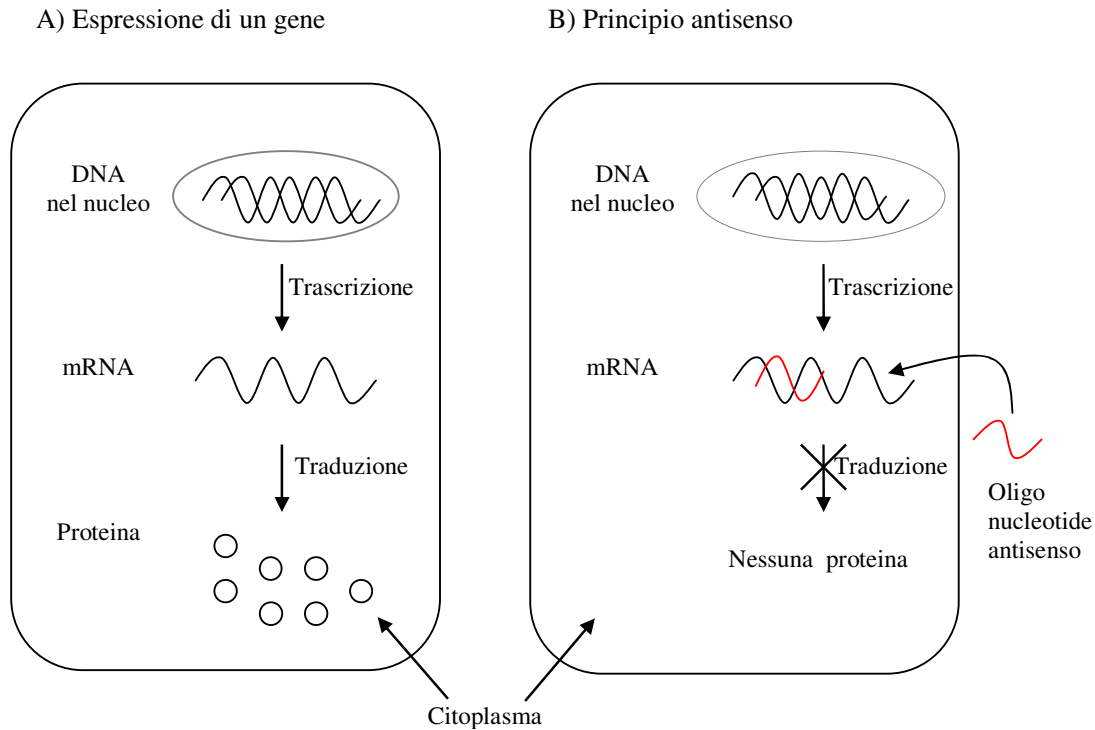


Fig. 1 Rappresentazione schematica del principio antisenso.

Essi riuscirono ad inibire la crescita del virus del sarcoma di Rous in una coltura cellulare, utilizzando un oligonucleotide tridecamero complementare ad una specifica regione dell'mRNA del virus. Da quel momento in poi, la ricerca rivolta alla regolazione dell'espressione genica mediante sonde antisenso di sintesi² ha visto una crescita esponenziale. Il maggiore vantaggio della inibizione a livello genico è rappresentato dalla specificità nel bloccare la produzione di certe proteine. Statisticamente, infatti, una particolare sequenza di 17 nucleotidi si rinviene solo una volta nell'intero genoma

umano, il che implica che un ODN di tale lunghezza può arrestare selettivamente l'espressione di un singolo gene. Inoltre, poiché l'espressione genica si traduce nella produzione di un ampio numero di proteine, la soppressione di questo processo, piuttosto che l'inibizione dell'attività di una determinata proteina mediante l'azione dei medicinali tradizionali, è ritenuta più efficiente. E' stato dimostrato che oligonucleotidi sintetici possono interferire nell'espressione genica anche mediante un meccanismo *decoy*, inibendo, cioè, l'interazione del DNA con fattori di trascrizione. Di conseguenza, l'inibizione dell'espressione genica usando ODNs ha in sé una grande promessa per lo sviluppo di una nuova classe di potenziali terapeutici³ contro infezioni virali⁴, molti tumori⁵, così come la maggior parte delle malattie batteriche ed ereditarie. In aggiunta, la supposta elevata selettività di questa strategia può prevenire gli indesiderati effetti collaterali causati dai classici medicinali, come la tossicità verso cellule sane. È chiaro che gli oligonucleotidi devono soddisfare ad una serie di requisiti per essere efficaci come medicinali. In primo luogo, l'ODN deve avere il potenziale per attraversare la membrana cellulare e/o nucleare così da arrivare al DNA o all'RNA bersaglio nel nucleo o nel citoplasma, rispettivamente. In secondo luogo esso deve sopravvivere alla degradazione enzimatica. Infine, l'ODN deve legare in maniera specifica ed efficiente l'acido nucleico bersaglio. Al fine di soddisfare ai suddetti requisiti, è stata preparata una pletora di analoghi di DNA (ad esempio fosforo-modificati, defosfo, zuccheromodificati).⁶ Tuttavia, sino ad ora solo pochi esempi di DNA-mimetici sono risultati essere sia resistenti nei confronti delle nucleasi sia in grado di formare complessi sufficientemente stabili con l'RNA e con il DNA (Tabella 1). Tra i più importanti analoghi degli ODNs, i fosforotioati (PS-ODNs),⁷ in cui uno degli atomi di ossigeno legati al fosforo è sostituito con un atomo di zolfo, sono stati ampiamente investigati come sonde antisense, sia in vitro che in vivo.⁸

Attualmente, inoltre, i PS-ODNs sono in fase di sperimentazione clinica come anti-cancro ed anti-infiammatori.³ È da notare che i PS-ODNs, assieme ai fosforoditioati⁹ (in cui due atomi di ossigeno del fosforo sono sostituiti da atomi di zolfo), sono gli unici la cui azione antisense si esplica attivando la ribonucleasi H.^{6a} D'altra parte, i PS-ODNs, carichi negativamente, sono chirali al fosforo e sintetizzati più convenientemente come miscele di diastereoisomeri. Queste caratteristiche hanno un effetto negativo sull'affinità di legame con gli acidi nucleici complementari. Da questo punto di vista, è stato dimostrato che tutte le configurazioni di tipo Rp destabilizzano un complesso in misura maggiore delle configurazioni di tipo Sp.^{7b} Inoltre, i PS-ODNs causano numerosi effetti collaterali in colture cellulari a causa della loro capacità di interagire con proteine intracellulari.¹⁰ Gli N3' → P5' fosforoammidati¹¹ rappresentano un'altra promettente classe di ODN modificati (tabella 1.A). Se da un lato il legame fosforoammidato è instabile in ambiente acido, dall'altro lato questi derivati achirali di DNA si legano fortemente all'RNA e sono in grado di arrestare in vitro il processo di traduzione¹². Un'altra classe di ODN comprende analoghi oligonucleotidici in cui il legame fosfodiesterico internucleosidico è rimpiazzato con una unità neutra ed achirale. In tal caso, se da un lato si assiste ad un aumento della resistenza alle nucleasi, dall'altro si osserva che solo i derivati come il tioformacetale¹³, il metilen (metilimmino) (MMI)¹⁴ e certi legami amidici¹⁵ hanno un effetto positivo sull'affinità di legame con l'RNA (tabella 1.B). Sono stati investigati come sonde antisense anche ODNs con una modificazione a livello del residuo zuccherino. Un interessante esempio è rappresentato da un analogo del DNA in cui il ribosio è sostituito da un 1,5-anidroesitolo.¹⁶ Questi ODNs formano complessi abbastanza stabili con gli acidi nucleici complementari (Tab. 1.C).

Una modifica strutturale nettamente più radicale rispetto a quelle finora elencate si è avuta con la sostituzione dello scheletro zucchero-fosfato con un motivo poliammidico aciclico. Questo nuovo analogo di DNA va sotto il nome di PNA (acido peptido nucleico).

Struttura generale		Modificazione	ΔT_m
--------------------	--	---------------	--------------

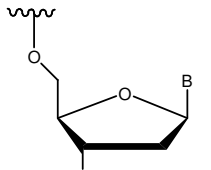
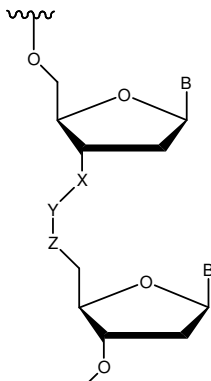
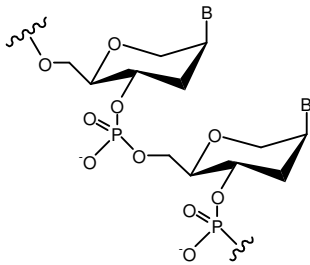
A) Modificazioni al fosfato		X	Y	Z	
	Fosforotioato	O	O	S	$S_p -0,3\ ^0C$ $R_p -1,6\ ^0C$
	N3'-P5' Fosforoamidato	NH	O	O	+2,0 0C
B) Defosfo-derivati		X	Y	Z	
	3'-tioformacetale	S	CH ₂	O	+1,3 0C
	MMI	CH ₂	NMe	O	+0,3 0C
	Ammide	CH ₂	CO	NH	+1,3 0C
C) Modificazioni allo zucchero					
	1,5-Anidroesitolo				+3,0 0C

Tabella 1: alcune interessanti modificazioni del DNA. B=base nucleotidica. ΔT_m = variazione (rispetto a duplex DNA/RNA classiche) della temperatura di fusione (T_m) indotta in duplex DNA/RNA da ogni singola modificazione dell'oligomero di DNA.

1.2. PNA: struttura e proprietà

1.2.1. Proprietà chimico-fisiche

Il PNA, descritto per la prima volta da Nielsen¹⁷ nel 1991, è un analogo di DNA in cui lo scheletro zucchero-fosfato è sostituito da unità di N-(2-amminoetil)-glicina, legate tra di loro mediante legame peptidico, mentre le basi puriniche (A e G) e pirimidiniche (C e T) sono legate all'azoto α dell'unità amminoacidica attraverso un metilen carbonile. In questo modo, l'unità ripetitiva consiste di sei atomi, esattamente come nel DNA e RNA (fig. 2) e le basi azotate mantengono tra loro la stessa distanza delle basi nel DNA naturale, per cui sono in grado di riconoscere le basi complementari su filamenti costituiti da DNA, RNA o PNA formando legami a idrogeno di tipo Watson-Crick. Per convenzione, il PNA viene rappresentato come un peptide, vale a dire con l'estremità N-terminale a sinistra (o verso l'alto) e l'estremità C-terminale a destra (o verso il basso). A differenza del DNA e dell'RNA, il PNA riconosce e lega filamenti complementari in entrambe le orientazioni, parallela e antiparallela. Nell'ibridazione di tipo antiparallelo l'estremità N-terminale del PNA lega il 3' del filamento di DNA mentre l'estremità C-terminale si appaia con il 5'. Al contrario, nell'ibridazione di tipo parallelo l'estremità N-terminale del PNA lega il 5' del filamento di DNA mentre l'estremità C-terminale si appaia con il 3'. Tuttavia, l'orientazione antiparallela illustrata in figura 2 è preferita.

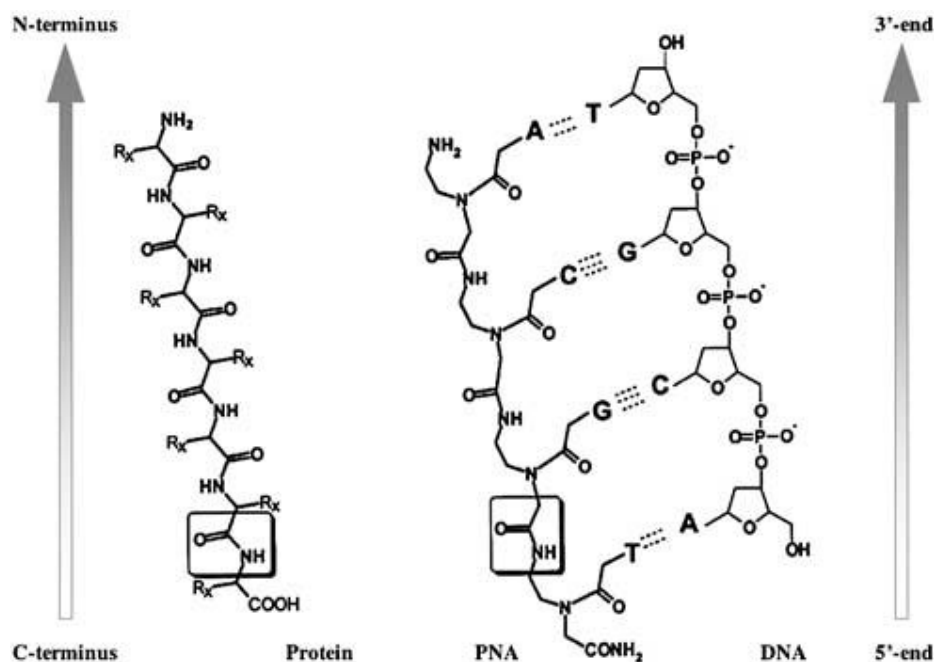


Fig. 2 Proteine, PNA e DNA a confronto. Il legame peptidico caratteristico sia del PNA che delle proteine è evidenziato nel riquadro. I legami a idrogeno di tipo Watson-Crick sono indicati dalle linee tratteggiate.

Nonostante la struttura del backbone sia totalmente differente da quella degli acidi nucleici naturali, le proprietà di ibridazione del PNA non solo sono conservate, ma addirittura potenziate. Infatti, la natura non carica dello scheletro di PNA è una importante caratteristica che fa sì che l'affinità di legame tra due filamenti di PNA e DNA sia molto più forte di quella tra due filamenti di DNA, proprio in virtù dell'assenza di repulsione elettrostatica. La maggiore stabilità delle duplex contenenti PNA si traduce in una più elevata temperatura di fusione.¹⁸ Un'ulteriore conseguenza della natura poliammidica dello scheletro di PNA è che la stabilità degli ibridi DNA/PNA è indipendente dalla concentrazione salina.

Questa proprietà può essere sfruttata quando le sequenze di DNA o RNA bersaglio sono coinvolte in strutture secondarie, in quanto queste ultime sono destabilizzate da bassa forza ionica, essendo minore il numero di ioni positivi

necessari a controbilanciare la repulsione elettrostatica tra i due filamenti carichi negativamente dell'acido nucleico. Questo facilita l'ibridazione con il PNA. I PNA presentano un'elevata stabilità biologica; sono, infatti, resistenti all'attacco di nucleasi e proteasi, sia nel siero umano che in estratti cellulari,¹⁹ di conseguenza il tempo di vita è esteso sia in vitro che in vivo. Alla resistenza alla degradazione enzimatica si accompagna, poi, una elevata stabilità chimica: molecole di PNA sono stabili in ambiente fortemente acido; a differenza di quanto si osserva nel DNA non si hanno fenomeni di depurinazione per trattamento in condizioni acide drastiche.²⁰ Solo in condizioni alcaline spinte ($\text{pH} > 11$), quando l'estremità N-terminale non è acetilata, si osservano reazioni collaterali, quali una trasposizione N-acilica della base nucleotidica presente all'estremità N-terminale (fig. 3a)²¹ o una rottura dell'oligomero di PNA in seguito a ciclizzazione²² (fig. 3b).

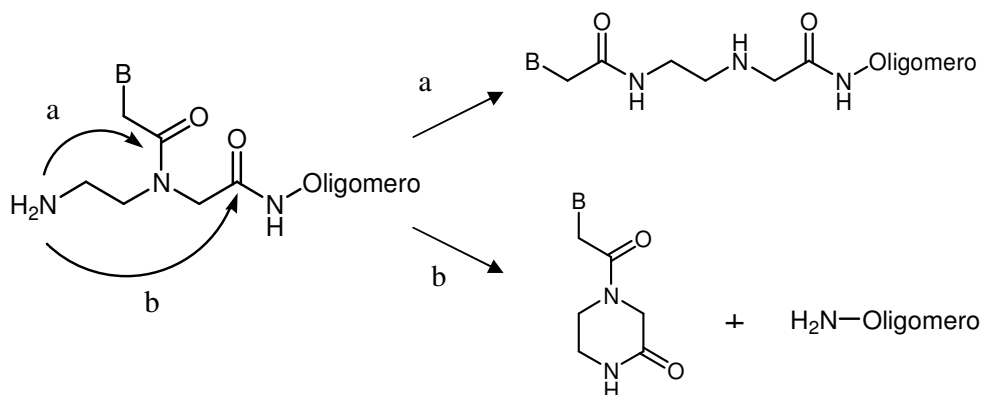


Fig. 3 Reazioni collaterali che si possono verificare in ambiente basico.

Il modo in cui il PNA interagisce con il DNA bersaglio dipende dalla composizione delle basi della sequenza coinvolta (fig. 4).

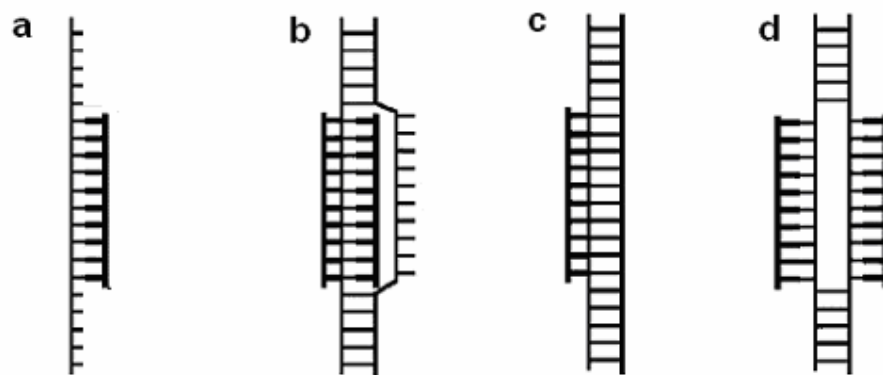


Fig. 4 Rappresentazione schematica delle modalità di legame del PNA al DNA. Il PNA è raffigurato in grassetto. **a.** Duplex PNA/DNA; **b.** Triplex $(PNA)_2/DNA$; **c.** Triplex $PNA/(DNA)_2$; **d.** Quadruplex PNA_2-DNA_2 .

Duplex PNA/DNA(RNA) (Fig. 4a). L'affinità di legame del PNA nei confronti di acidi nucleici complementari è stata ampiamente studiata mediante spettroscopia UV. PNA contenenti sia purine che pirimidine legano con elevata specificità sequenze bersaglio formando esclusivamente strutture di tipo duplex. Per esempio, il pentadecamero 5'(TGT ACG TCA CAACTA) forma col DNA una duplex antiparallela più stabile ($T_m = 69.5^\circ\text{C}$) della corrispondente duplex DNA/DNA ($T_m = 53.3^\circ\text{C}$).²³ E' possibile osservare anche la formazione dell'ibrido parallelo, ma la temperatura di fusione in tal caso è significativamente più bassa ($T_m = 56.1^\circ\text{C}$) (Tabella 2).

DNA(RNA) complementare	Duplex	T_m^a
3' d(ACA TGC AGT GTT GAT)	DNA/DNA	53.3 °C (63 °C) ^b
3' d(ACA TGC AGT GTT GAT)	PNA/DNA (antiparallelo)	69.5 °C (67 °C) ^b
3' d(TAG TTG TGA CGT ACA)	PNA/DNA (parallelo)	56.1 °C
3' r(ACA UGC AGU GUU GAU)	DNA/RNA	50.6 °C
3' r(ACA UGC AGU GUU GAU)	PNA/RNA (antiparallelo)	72.3 °C

Tabella 2 Temperature di fusione (T_m) per duplex DNA/DNA, DNA/RNA, PNA/DNA e PNA/RNA. I valori di T_m^a sono stati misurati a 260 nm in 100 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 0.1 mM EDTA, pH = 7.0; quelli relativi a T_m^b in un tampone ad alta concentrazione salina (1 M NaCl).

In generale, per duplex antiparallele PNA/DNA si osserva un aumento della temperatura di fusione di circa 1 °C per base rispetto alla corrispondente duplex DNA/DNA. La stabilità di ibridi PNA/DNA è indipendente dalla forza ionica del mezzo; al contrario, la temperatura di fusione di ibridi DNA/DNA aumenta all'aumentare della concentrazione salina, fino quasi a eguagliare quella di un ibrido PNA/DNA a concentrazione 1 M di NaCl.

Duplex PNA/RNA antiparallele sono molto stabili, mostrano un incremento nel valore di T_m di circa 1.5 °C/base rispetto alle corrispondenti duplex DNA/RNA. Infine, duplex PNA/RNA sono in media 0.2-0.5 °C/base più stabili delle corrispondenti duplex PNA/DNA. Complessi PNA/DNA sono più sensibili alla presenza di un singolo mismatch rispetto ai complessi DNA/DNA, come testimoniato dall'abbassamento della T_m (dai 9 ai 18 °C).²³ Questo elevato livello di discriminazione è una prova dell'alta selettività di sequenza dei PNA.

Triplex (PNA)₂/DNA (Fig. 4b). PNA omopirimidinici sono in grado di formare addotti molto stabili di tipo tripla elica PNA:DNA:PNA con tratti

omopurinici di DNA. In questi casi, l'accoppiamento delle basi avviene via legami a idrogeno sia di tipo Watson-Crick, che di tipo Hoogsteen. Se la sequenza bersaglio è situata su un frammento di DNA a doppia elica, il PNA è in grado di spiazzare il filamento complementare aprendo la doppia elica, formando una struttura definita come "P-loop", in un processo chiamato "strand invasion" (o "strand displacement").²⁴ In particolare, un primo filamento di PNA va a legare il filamento omopurinico di DNA con riconoscimento delle basi secondo Watson-Crick e con orientamento antiparallelo; successivamente, un secondo filamento di PNA va a legare lo stesso filamento omopurinico di DNA in modo parallelo mediante legami di tipo Hoogsteen con conseguente formazione di una tripla elica locale (PNA)₂/DNA. La stabilità termica della triplex è molto alta ($T_m = 73^\circ\text{C}$ per un PNA T₁₀) e dipende dalla lunghezza dell'oligomero (si registra un aumento di circa 10°C per base).²⁴ Tuttavia, in condizioni fisiologiche di concentrazione salina e pH la formazione del complesso è piuttosto lenta e richiede la protonazione della citosina in posizione N3 affinché si possano stabilire i legami di tipo Hoogsteen con gli N7 dei residui di guanina. E' possibile migliorare la cinetica del processo utilizzando il cosiddetto bis-PNA, vale a dire legando i due filamenti omopirimidinici di PNA con un linker flessibile (ad esempio tre unità di acido 8-ammino-3,6-diossaottanoico), il che si traduce in una minore penalizzazione in termini di entropia. Inoltre, sostituendo i residui di citosine nel filamento Hoogsteen di un bis-PNA con pseudoisocitosine (ΨIC) – che mimano citosine permanentemente protonate – si può abbattere la dipendenza dal pH.²⁵ (Fig. 5)

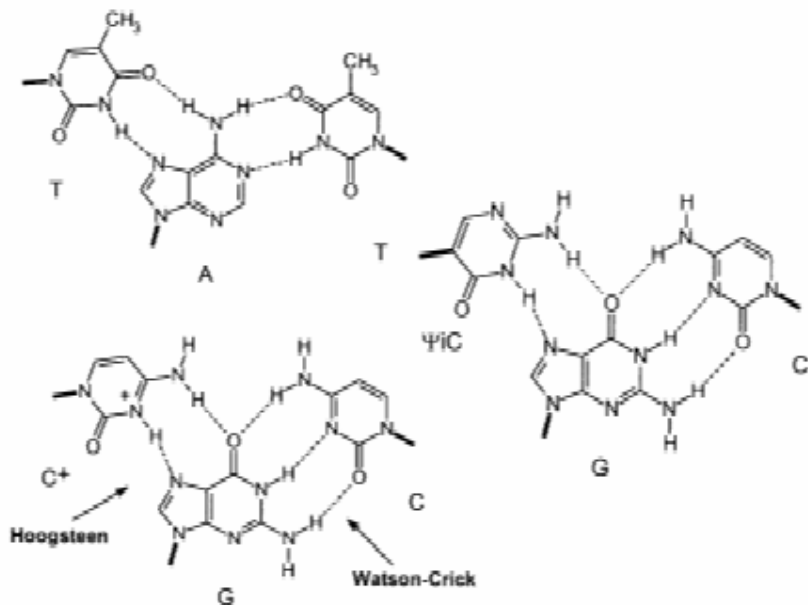


Fig. 5 Rappresentazione delle modalità di riconoscimento delle basi secondo Watson-Crick e Hoogsteen in una triplex (PNA)₂/DNA.

Triplex PNA/(DNA)₂ (Fig. 4c). PNA omopirimidinici con alto contenuto di citosine non danno *strand invasion*, ma legano doppie eliche di DNA con legami di tipo Hoogsteen portando alla formazione di triplex di stechiometria PNA/(DNA)₂.²⁶

Quadruplex PNA₂-DNA₂ (Fig. 4d). Oligomeri pseudocomplementari di PNA (pcPNA), in cui le basi naturali di adenina e timina sono sostituite, rispettivamente, con basi non naturali di diamminopurina e tiouracile (Fig. 6), danno il cosiddetto fenomeno della *double duplex invasion*, con formazione di strutture quadruplex in cui i due filamenti di PNA si combinano con i due filamenti di DNA disponendosi in maniera diametralmente opposta.

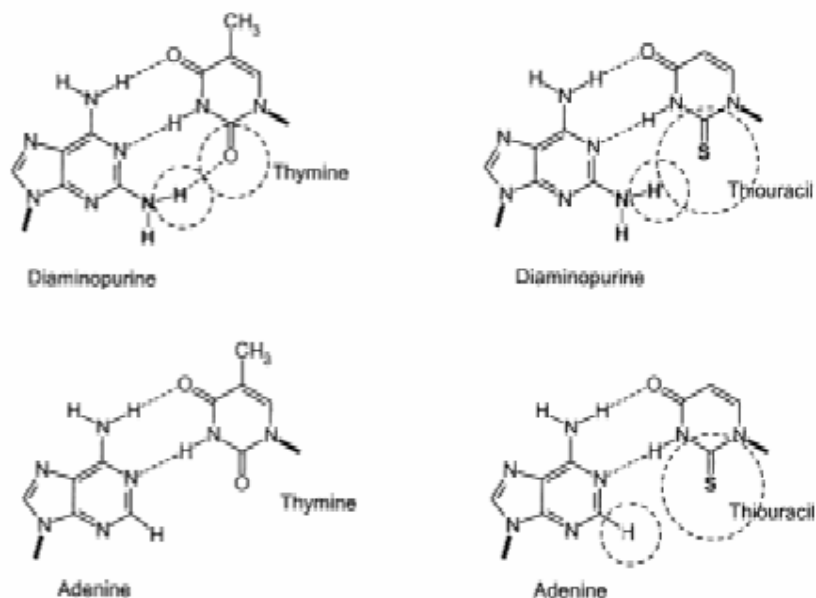


Fig. 6 Coppie di basi, naturali e non, a confronto. Affinché si abbia “double duplex invasion” il target deve avere un contenuto di basi AT pari almeno al 50% e nel PNA tutte le coppie di basi A/T devono essere sostituite con la coppia 2,6-diamminopurina/2-tiouracile. Questa coppia di basi è molto instabile per motivi di ingombro sterico, per cui le due sequenze complementari di PNA non si appaieranno tra di loro, ma andranno a legare più efficientemente i corrispondenti filamenti di DNA.

1.2.2. Strutture tridimensionali di complessi di PNA

Per la maggior parte dei complessi contenenti PNA è stata determinata la struttura tridimensionale, grazie all'impiego di diverse tecniche. In particolare, utilizzando tecniche NMR in soluzione sono stati caratterizzati una duplex PNA/RNA²⁷ e una duplex PNA/DNA,²⁸ mentre con tecniche di diffrazione di raggi X su cristallo singolo sono stati caratterizzati strutturalmente una triplex PNA₂/DNA,²⁹ tre duplex PNA/PNA^{30,31,32} ed una duplex PNA/DNA^{33,34} (Fig. 7).

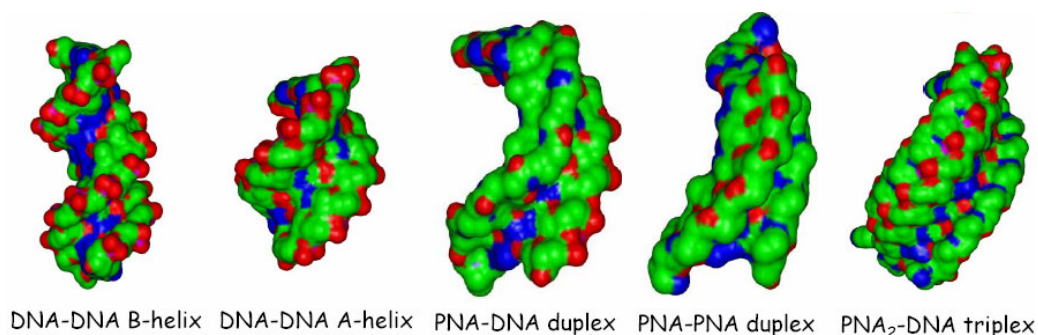


Fig. 7 Strutture tridimensionali di complessi di DNA e di PNA a confronto.

Studi NMR²⁸ hanno mostrato che un ottamero antiparallelo PNA-DNA contiene elementi sia della forma A (posizione laterale delle coppie di basi) sia della forma B del DNA (curvatura dello scheletro, inclinazione delle coppie di basi, altezza dell'elica). L'elica destrorsa contiene approssimativamente 13 paia di basi per giro, mentre il DNA in forma B ne contiene 10. Rispetto a un DNA a doppio filamento, il solco maggiore della duplex PNA/DNA risulta essere più largo, mentre il solco minore è più stretto e meno profondo. Inoltre i legami ammidici dello scheletro di PNA sono in conformazione trans e gli atomi di ossigeno del braccetto che collega lo scheletro alle nucleobasi sono diretti verso il C-terminale.

Gli spettri di dicroismo circolare delle duplex antiparallele PNA/DNA sono simili agli spettri DNA/DNA indicando un avvolgimento destrogiro dell'elica, mentre spettri CD di duplex parallele PNA/DNA rivelano una struttura che differisce notevolmente dalle strutture A e B del DNA.^{23,35}

L'analisi strutturale in soluzione di duplex PNA/RNA ha evidenziato che il PNA, quando è ibridizzato all'RNA, adotta una conformazione elicoidale di tipo A: i legami ammidici sono tutti in conformazione cis ed i protoni delle ammidi secondarie dello scheletro di PNA non partecipano in alcun modo alla formazione di legami idrogeno per la struttura molecolare. Gli spettri CD di duplex PNA/RNA antiparallele indicano la formazione di eliche destrogire

con una geometria simile alla forma A e B (approssimativamente 10 e 11 paia di basi per giro rispettivamente).

I PNA sono composti caratterizzati dalla mancanza di centri chirali e quindi non mostrano preferenza per uno specifico senso di avvolgimento dell'elica, come evidenziato dalle analisi della struttura a raggi X di una duplex PNA/PNA.³⁰ Le basi nucleotidiche si dispongono quasi perpendicolarmente all'asse dell'elica, con una torsione approssimativamente di solo 5-6°, in cui l'appaiamento è di tipo Watson-Crick. Le coppie di basi sono spostate di 8,3 Å rispetto all'asse dell'elica, formando un'elica larga 28 Å con 18 basi per giro (paragonate alle 10 ed 11 basi per giro della forma A e B del DNA rispettivamente). Siccome entrambi i filamenti si dispongono piuttosto vicini l'un l'altro, la doppia elica PNA/PNA presenta un solco maggiore molto largo e profondo ed un solco minore stretto e poco profondo. Inoltre i gruppi ammidici dello scheletro del PNA sono nella conformazione trans ed i gruppi carbonilici del braccetto sono diretti verso il C-terminale. Le duplex PNA/PNA danno origine a nuove strutture, chiamate eliche P. E' possibile indurre chiralità nelle eliche di PNA mediante coniugazione del PNA con amminoacidi chirali. Nel 1996, Haaima e i suoi collaboratori hanno riportato la sintesi di monomeri di PNA chirali, nei quali la glicina presente nello scheletro è stata sostituita con amminoacidi D o L.³⁶ Esperimenti di dicroismo circolare hanno dimostrato che la configurazione degli amminoacidi induce nel PNA una specifica elicità: monomeri D inducono un avvolgimento destrogiro, mentre monomeri L inducono un avvolgimento levogiro.³⁷ Questi PNA ad alto vincolo sterico hanno mostrato una preferenza totale per l'orientazione antiparallela rispetto al DNA, come evidenziato da dati UV, CD e di spettrometria di massa ESI.³⁸

La struttura della triplex PNA/DNA/PNA²⁹ è simile a quella delle duplex PNA/PNA con 16 paia di basi per giro. L'elica risulta notevolmente allargata

con uno spostamento delle basi di circa 6,8 Å rispetto all'asse dell'elica, paragonata ai 4,5 Å della forma A del DNA. Le basi sono disposte quasi perpendicolarmente all'asse dell'elica, caratteristica della forma B del DNA. Inoltre, le interazioni di Watson-Crick tra le basi azotate del PNA e del DNA sono fortemente stabilizzate da ulteriori legami idrogeno con il solvente nel solco minore. Tra i gruppi fosfato del DNA e i protoni ammidici dello scheletro di PNA si stabiliscono dei legami idrogeno che, insieme alle forze di Van der Waals e alla mancanza di repulsioni elettrostatiche, rappresentano i principali fattori responsabili dell'enorme stabilità della tripla elica.

In tabella 3 sono riassunti i principali parametri strutturali che caratterizzano le varie tipologie di complessi di PNA.

	Passo dell'elica (°C)	Innalzamento assiale di un'unità nucleotidica rispetto alla precedente (Å)	Numero di basi per giro d'elica
PNA/DNA (raggi-X)	23.2	3.5	16
PNA/PNA	19.8	3.2	18
PNA ₂ /DNA triplex	22.9	3.4	16
PNA/DNA (NMR)	28.0	3.3	13
DNA/DNA A	32.7	2.6	11
DNA/DNA B	34.0	3.4	10

***Tabella 3** Strutture di complessi di PNA e di DNA a confronto.*

1.3. PNA: applicazioni

In virtù della loro alta stabilità termica e resistenza alle proteasi ed alle nucleasi, i PNA sono i candidati ideali per la modulazione artificiale dell'espressione genica e sono tutt'oggi utilizzati non solo come potenziali

agenti terapeutici, ma anche come potenti strumenti in biologia molecolare ed in diagnostica.

1.3.1. Applicazioni terapeutiche

Recentemente, numerose strategie sono state proposte per bersagliare molecole coinvolte nella regolazione dell'espressione genica; tra i bersagli molecolari citiamo i promotori, i fattori di trascrizione e l'mRNA. Numerosi esempi hanno mostrato come queste strategie siano in grado di alterare funzioni biologiche specifiche. In particolare, l'azione del PNA sull'espressione genica può avvenire attraverso differenti meccanismi: antigene, antisenso e decoy (fig. 8).

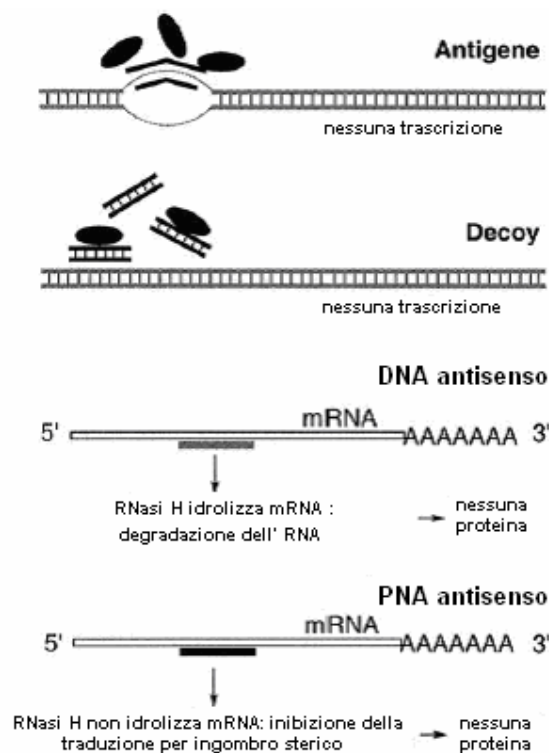


Fig. 8 Rappresentazione schematica delle strategie antigene, decoy ed antisenso.

Nella *strategia antisense* il bersaglio è l'mRNA: un oligonucleotide antisense lega in maniera specifica una regione dell'mRNA target, conducendo ad un arresto della traduzione nella corrispondente proteina. Il meccanismo con cui un ON esplica l'azione antisense non è stato ancora univocamente definito. Si pensa, comunque, che due possano essere le principali forme di interferenza: nel primo meccanismo si ipotizza che l'alta affinità di legame di un ON con l'RNA target blocchi il processo di traduzione per motivi di ingombro sterico, per cui il complesso ON/RNA impedirebbe l'interazione dell'RNA con i ribosomi richiesti per la produzione delle proteine; nel secondo, più accreditato meccanismo antisense, si ha l'attivazione di un enzima, la ribonucleasi H, che va a degradare in maniera specifica solo il filamento di mRNA di una duplex ON/RNA. Oligonucleotidi che hanno la capacità di attivare la ribonucleasi H sono i fosfodiesteri ed i fosforotioati, mentre i PNA fanno parte di quegli oligonucleotidi modificati che non sono in grado di stimolare la ribonucleasi H all'atto della formazione del complesso con l'RNA target.³⁹ La capacità antisense dei PNA è stata oggetto di numerosi studi.⁴⁰⁻⁴⁸ E' stato dimostrato ad esempio che PNA antisense alterano lo splicing del pre-mRNA del recettore dell'interleuchina murina IL-5R α risultando potenzialmente utili nel trattamento di malattie infiammatorie quali sindromi eosinofiliche.⁴⁹ PNA antisense diretti contro il gene del recettore dell'acido retinoico (RAR) hanno portato ad una inibizione del 90% dell'espressione del gene bersaglio.⁵⁰ I PNA sono stati anche utilizzati per l'inibizione dell'espressione genica in vivo; questi risultati sono stati ottenuti per permeazione diretta in procarioti, indicando un possibile uso di PNA come antibiotici.⁵¹ Grazie a questi risultati incoraggianti, l'uso di PNA antisense è stato successivamente esteso ad altre patologie, come il morbo di Alzheimer,⁵² con risultati positivi.

Nella *strategia anti-gene* il bersaglio è il DNA. L'effetto del PNA come agente antigene è basato sul blocco della trascrizione e conseguente inibizione della crescita del filamento di mRNA dallo stampo di DNA mediata dall'RNA polimerasi.

I PNA sono in grado di arrestare il processo di trascrizione grazie alla loro abilità a formare strutture a tripla elica stabili $(PNA)_2/DNA$, mediante strand invasion (fig. 9).

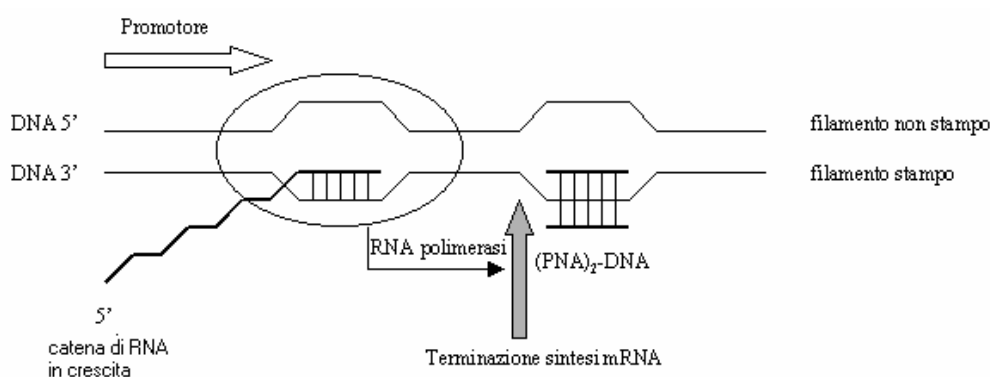


Fig. 9 Inibizione della trascrizione tramite la formazione di una tripla elica.

L'applicazione del PNA come agente antigene è, pertanto, limitata a tratti polipurinici del genoma e l'invasione di una duplex di DNA è piuttosto lenta a concentrazioni saline fisiologiche.⁵³ Modificazioni del PNA, quali per esempio l'aggiunta di residui di lisina carichi positivamente nonché l'introduzione di basi non naturali come la pseudoisocitosina, possono però aumentare la velocità di associazione del PNA con il DNA e la stabilità della triplex.²⁵

Utilizzando un peptide segnale di localizzazione nucleare, un PNA diretto contro il gene *c-myc*⁵⁴ è stato veicolato nel nucleo ed un effetto antigene è stato osservato, un meccanismo difficilmente riscontrabile con altri analoghi di oligonucleotidi. La coniugazione con composti capaci di interagire con specifici recettori, come il diidrotestosterone, si è rivelato un buon metodo per

la veicolazione cellulare e nucleare di PNA antigene, che sono stati indirizzati in cellule di carcinoma prostatico.⁵⁵ Dopo questi studi pionieristici, altre applicazioni di PNA antigene sono state descritte, per esempio nel trattamento della ipertensione in vivo.⁵⁶ E' stato altresì dimostrato che PNA antigene diretti contro il DNA di N-myc possono avere un effetto drammatico sulla proliferazione cellulare di cellule tumorali umane di neuroblastoma.⁵⁷

Modulazione della trascrizione non significa esclusivamente inibizione o terminazione, ma può anche voler dire attivazione: il filamento di DNA che resta disappaiato in seguito alla *strand invasion* da parte del PNA può essere riconosciuto dall'RNA polimerasi e fungere, quindi, da sito iniziatore della trascrizione.⁵⁸

Nella *strategia decoy* il bersaglio sono i fattori di trascrizione. Il meccanismo di azione differisce da quello antisense, ma le linee guida sono le stesse: il fattore di trascrizione riconosce l'oligo esogeno come target legandosi ad esso, con conseguente impossibilità di raggiungere il reale target genomico. Pochi studi hanno dimostrato l'uso del PNA come possibile decoy;⁵⁹ duplex PNA/PNA o PNA/DNA a causa delle loro differenze strutturali con il duplex DNA/DNA non vengono riconosciuti dai fattori di trascrizione. Utili strumenti per ovviare a ciò si sono rivelate le cosiddette chimere di DNA-PNA,⁵⁹ (sequenze ibride di PNA e DNA legate tra loro covalentemente), in cui il PNA agisce come elemento di riconoscimento di sequenza e la parte di DNA funziona da substrato per le proteine che interagiscono con il DNA (nucleasi, fattori di trascrizione).^{60, 61}

1.3.2. Applicazioni in biologia molecolare

➤ *PNA come “enzima di restrizione artificiale”*

Molte sequenze non sono riconosciute dagli enzimi di restrizione; in questi casi, può essere di aiuto un PNA con sequenza complementare a quella di riconoscimento. Il PNA lega la sequenza bersaglio sulla doppia elica di DNA mediante *strand invasion*, quindi un filamento di DNA viene spiazzato rimanendo “disappaiato” e può così diventare substrato dell’enzima S1 che va a degradare il filamento di DNA in frammenti ben definiti. Per aumentare l’efficienza della degradazione enzimatica del DNA è possibile utilizzare due PNA diversi che agiscono in cis (legano lo stesso filamento di DNA) o in trans (legano filamenti opposti).¹⁹

➤ *Uso di PNA nella tecnica PARC (PNA-assisted rare cleavage)*

L’uso di enzimi di restrizione per il taglio di una sequenza di DNA in corrispondenza di una sola posizione rappresenta un problema se il sito di restrizione è presente più volte lungo la sequenza in esame. Ancora una volta, il problema può essere risolto con PNA. La sequenza di PNA è scelta in modo tale da “coprire” il sito di metilazione/restrizione sul DNA e proteggerlo dalla metilazione enzimatica, mentre gli altri siti di metilazione/restrizione non protetti saranno metilati. A questo punto, per rimozione del PNA e successiva digestione, è possibile rompere il filamento di DNA esclusivamente nella posizione desiderata.⁶²

➤ *Uso di PNA nel Southern blotting*

Il Southern blotting è una tecnica usata per rivelare la presenza di specifiche sequenze di DNA in una miscela complessa. L’inconveniente principale di questa tecnica è che essa prevede una sequenza di operazioni abbastanza laboriosa, con lunghi e numerosi cicli di lavaggi. Il DNA, preventivamente digerito con enzimi di restrizione, è separato mediante

elettroforesi su gel di agarosio. Il gel viene quindi immerso in una soluzione alcalina (per denaturare il DNA), viene coperto da un foglio di nitrocellulosa e sopra di questo viene posta una pila di fogli assorbenti. A questo punto il foglio viene separato dal gel e immerso in una soluzione contenente una sonda (filamento di DNA) marcata in vario modo (tramite fluorescenza o radioattività) che ibridizza con sequenze complementari presenti sul foglio, permettendo, in questo modo, di identificarle. Un PNA fluorescente, invece, essendo capace di ibridizzare in condizioni di bassa forza ionica DNA denaturato, consente di sottoporre la miscela direttamente a elettroforesi su gel di agarosio. A questo punto, gli ibridi DNA/PNA sono trasferiti su una membrana di nylon, seccati ed identificati mediante tecniche standard di chemiluminescenza. Nelle stesse condizioni, una duplex DNA/DNA non sopravviverebbe, mentre la duplex PNA/DNA resta intatta in virtù della elevata stabilità termica che la contraddistingue.⁶³

➤ *Purificazione di acidi nucleici*

PNA possono essere utilizzati anche per purificare acidi nucleici target. Ad esempio, PNA con sei residui di istidina può consentire la purificazione di un acido nucleico target mediante cromatografia di affinità con nichel.⁶⁴

1.3.3. Applicazioni in diagnostica

I PNA sono stati utilizzati per la rivelazione di sequenze specifiche in combinazione con molti metodi diagnostici,⁶⁵ quali la PCR-clamping,⁶⁶ la PCR real-time,⁶⁷ l'elettroforesi capillare,⁶⁸ la spettrometria di massa MALDI-TOF,⁶⁹ biosensori elettrochimici,^{70,71} e microbilance al quarzo (QCM).⁷² Un' interessante applicazione diagnostica è rappresentata dai cosiddetti *PNA beacons*⁷³ o i cosiddetti *light up probes*, che sono "accesi" per complessazione con il DNA, a causa della formazione della duplex PNA/DNA.⁷⁴

➤ *Uso di PNA in biosensori*

La tecnologia dei biosensori cerca di combinare le proprietà uniche di riconoscimento delle strutture biologiche con dispositivi trasduttori ingegnerizzati in modo da fornire avanzate capacità di rivelazione. Sonde a PNA, con la loro alta sensibilità, migliore specificità, maggiore stabilità e la capacità di legare un bersaglio con maggiore affinità e più rapidamente, rappresentano senza dubbio un sistema ideale per la rilevazione di un determinato analita bersaglio. Biosensori basati su risonanza superficiale di plasmoni (BIAcore) sono stati utilizzati per lo studio della cinetica di ibridazione dei complessi PNA/DNA⁷⁵ e sono stati proposti come strumenti analitici per prodotti di PCR.⁷⁶ Sonde a PNA sono state utilizzate per la rivelazione di una mutazione puntiforme (W1282X) nella fibrosi cistica utilizzando uno strumento BIAcore.⁷⁷ Più di recente, è stato utilizzato un oligomero di PNA contenente una regione chirale centrata sulla base mutata; in questo caso, la selettività di sequenza è risultata molto migliorata rispetto ai PNA achirali, permettendo una migliore distinzione fra casi di omozigosi ed eterozigosi.⁷⁸

Molto interessanti sono anche i cosiddetti *PNA beacons*. *Molecular beacons* (MBs) sono molecole recanti un fluoroforo ed un attenuatore di fluorescenza (*fluorescence-quencher*) alle due estremità di un filamento di acido nucleico. Quando non ancora ibridizzato, la sua conformazione è tale che il fluoroforo ed il *quencher* si vengono a trovare l'uno in prossimità dell'altro, per cui non si ha nessuna emissione di segnale. In seguito al legame con il bersaglio, la molecola si distende, il fluoroforo ed il quencher si vengono a trovare lontani e si ha pertanto emissione di fluorescenza (fig. 10).⁷⁹



Fig. 10 Principio generale di un PNA beacon. Si osserva fluorescenza solo dopo formazione della duplex.

➤ PNA microarrays

Ricorrendo a procedure simili a quelle descritte per i DNA arrays,^{80,81} sono stati recentemente preparati PNA microarrays per il riconoscimento di specifiche sequenze di DNA estratto da semi di soia Roundup Ready.⁸² Sono stati anche proposti metodi alternativi per la rivelazione della ibridazione su PNA microarrays.^{83,84} I microarrays a PNA sono quindi dispositivi molto promettenti per la rivelazione simultanea di molte sequenze di DNA, in particolare nel riconoscimento di polimorfismi di singolo nucleotide (SNP).

1.4. Delivery di PNA

1.4.1. Delivery di PNA nel compartimento cellulare

Uno dei problemi più rilevanti circa l'utilizzo dei PNA in terapia è correlato al basso livello di internalizzazione di queste molecole nelle cellule. A causa dell'assenza di gruppi carichi nello scheletro, i PNA hanno bassa solubilità e forte tendenza ad aggregare. E' stato osservato che la solubilità del PNA diminuisce all'aumentare della lunghezza dell'oligomero e del rapporto purine : pirimidine.⁸⁵ Per migliorare la solubilità degli oligomeri di PNA è possibile coniugare molecole cariche quali amminoacidi ad una delle due estremità oppure utilizzare monomeri di PNA modificati in cui l'unità di glicina sia sostituita da amminoacidi con catene laterali cariche. Chimere

PNA-DNA sono state altresì disegnate da una parte per migliorare il basso uptake cellulare e la bassa solubilità dei PNA e dall'altra per ottenere molecole con proprietà strutturali e biologiche tipiche del DNA.

Una grande varietà di sistemi di trasporto cellulare sono stati messi a punto e testati sperimentalmente. Tali sistemi si possono suddividere in due categorie, quelli che usano i PNA tal quali e quelli che usano PNA modificati, coniugati cioè ad opportuni ligandi, quali peptidi “vettori” o sequenze “guida”.⁸⁶ Sebbene tali sistemi non forniscano un metodo generale per il delivery cellulare di PNA, tuttavia costituiscono un ricco repertorio per orientarsi più agevolmente nella scelta del carrier più idoneo.

1.4.1.a Delivery di PNA non modificati

La prima generazione di vettori sviluppata sono stati i liposomi, vescicole colloidali generalmente composte di un doppio strato di fosfolipidi e colesterolo. I liposomi possono essere neutri o cationici, a seconda della natura dei fosfolipidi. L'acido nucleico può essere facilmente incapsulato all'interno del liposoma, che contiene un compartimento acquoso, oppure può essere legato alla superficie mediante interazioni elettrostatiche. Tali vettori, a causa della loro carica positiva, hanno alta affinità per le membrane cellulari, che in condizioni fisiologiche sono cariche negativamente.⁸⁷ L'internalizzazione di tali sistemi avviene con meccanismo di endocitosi; per evitare i risultanti problemi di compartimentalizzazione, può essere conveniente modulare la permeabilità della membrana plasmatica generando, ad esempio, una permeabilizzazione transiente e consentire, così, all'oligonucleotide di entrare in cellula per diffusione. Tale approccio coinvolge la formazione di pori transienti nella membrana, indotti chimicamente mediante permeabilizzazione con streptolisina O,⁸⁸ meccanicamente mediante microiniezione,⁸⁹ oppure prodotti mediante

elettroporazione.⁹⁰ Questi ultimi metodi, ovviamente, non sono applicabili in vivo, poiché implicano una rottura della membrana cellulare. In alcuni lavori è stato anche riportato il trasporto diretto in cellula di PNA senza ricorso ad alcuno dei protocolli sopra citati.⁹¹ Tuttavia, in tal caso, le elevate concentrazioni di PNA che si è costretti ad utilizzare ($\approx 20 \mu\text{M}$) aumentano fortemente il rischio di effetti tossici.

1.4.1.b Delivery di PNA modificati

Legare covalentemente PNA a motivi/frammenti di molecole che sono riconosciute dalle cellule si presenta come una semplice e conveniente alternativa alle tecniche di traslocazione standard sopra menzionate. A tale riguardo, possiamo citare la coniugazione di PNA ad opportuni ligandi “guida” (capaci di interagire con specifici recettori) in grado di veicolare il PNA esclusivamente nelle cellule bersaglio, così da abbattere il rischio di effetti collaterali indesiderati nelle cellule sane, secondo un meccanismo di endocitosi mediata da recettori. Quest’ultima presuppone l’esistenza di proteine transmembranaliche in grado di interagire in modo specifico con alcune molecole presenti nei liquidi extracellulari. Le proteine transmembranaliche sono definite con il termine di recettori, mentre le sostanze verso le quali esse risultano specifiche sono dette ligandi. L’endocitosi mediata da recettori è altamente selettiva, la selettività dipendendo dalla specificità dell’interazione tra il ligando ed il rispettivo recettore. Da questo punto di vista, tuttavia, sono ancora pochi gli studi che hanno investigato l’efficacia di questo sistema di veicolazione alternativo. La coniugazione con il diidrotosterone, ad esempio, si è rivelata un buon metodo per la veicolazione cellulare/nucleare di PNA antigene in cellule di carcinoma prostatico.⁵⁵ Se da un lato il trasporto mediato da recettore è un processo di elevata specificità, dall’altro lato, tuttavia, può risultare poco efficace, probabilmente a causa della quantità

limitata di recettori disponibili sulla superficie della cellula e dell'intrappolamento del materiale da trasportare negli endosomi/lisosomi.⁹²

Una strategia relativamente nuova per il trasporto cellulare di macromolecole trae origine dalla scoperta che alcune proteine sono capaci di passare dall'ambiente extracellulare all'interno della cellula senza endocitosi mediata da recettore. Le prime proteine che si è visto possedere tale capacità sono state la proteina Tat del virus HIV⁹³ ed il fattore di trascrizione Antennapedia di *Drosophila*.⁹⁴ Tali proteine presentano in determinati punti della loro sequenza amminoacidica particolari gruppi di amminoacidi che rappresentano una specie di "etichetta" che fa sì che essi vengano riconosciuti da specifici recettori presenti nella membrana e ciò fa scattare i meccanismi che portano al trasferimento della proteina all'interno del compartimento designato.⁹⁵ Di qui, l'idea di sintetizzare chimicamente i peptidi corrispondenti alle rispettive regioni di tali proteine e di coniugarli alle molecole da trasportare. Per la loro capacità di attraversare la membrana cellulare, tali peptidi sono stati definiti "cell-penetrating peptides" (CPP). Generalmente sono peptidi costituiti da un numero di residui amminoacidici inferiore a 30 ed hanno una carica netta positiva. Il primo CPP che si è visto essere in grado di trasportare oligomeri di PNA all'interno di cellule deriva dalla terza elica dell'omeodominio della proteina Antennapedia (pAntp).⁹⁶ Da allora, il numero di peptidi (sia derivati da proteine che si trovano in natura, sia progettati e sintetizzati) che hanno dimostrato di possedere tale capacità è andato progressivamente crescendo.⁹⁷ I CPP hanno dato prova di essere un efficace sistema di trasporto per svariate molecole bioattive, non solo oligonucleotidi ma anche peptidi e proteine. Tuttavia, il reale meccanismo con cui avviene il processo di traslocazione è ancora oggetto di dibattito. In alcuni recenti lavori è riportato come il passaggio sia principalmente mediato dall'endocitosi, ma tali lavori non sono in grado di spiegare come mai sull'uptake mediato dai CPP non abbiano

effetto gli inibitori dell'endocitosi o le basse temperature (+ 4°C).⁹⁸ Probabilmente ci sono differenti classi di CPP che usano differenti *pathway* all'interno della cellula e l'endocitosi è semplicemente una parte dell'intero puzzle. Sebbene i risultati sperimentali sinora ottenuti indichino i CPP come un promettente strumento per future applicazioni farmaceutiche, ulteriori studi sono necessari al fine di delucidare il meccanismo di traslocazione attraverso il quale tali molecole sono introdotti all'interno della cellula.

E' opportuno sottolineare anche che le potenzialità terapeutiche dei coniugati PNA-peptide possono essere limitate dal fatto che motivi peptidici, anche se legati covalentemente al PNA, hanno bassa stabilità nei fluidi biologici e sono inevitabilmente soggetti a degradazione enzimatica.⁹⁹ A tale riguardo, si è visto che è possibile migliorare la stabilità dei peptidi utilizzando i D-amminoacidi: in tal modo, il peptide sarà più resistente all'azione delle proteasi¹⁰⁰ e, quindi, sarà un miglior "accompagnatore" per il PNA. L'uso dei D-amminoacidi, tuttavia, può comportare una diminuzione in termini di attività biologica. Un espediente a cui si può ricorrere per evitare ciò prevede l'uso di peptidi cosiddetti retro-inversi¹⁰¹ che, oltre ad essere maggiormente resistenti alla degradazione enzimatica, mantengono intatta la loro attività.¹⁰² Herrada e i suoi collaboratori^{101,b} hanno, infatti, dimostrato come l'efficienza di uptake di un PNA venga sensibilmente incrementata in colture cellulari neuronali se il PNA è coniugato al peptide retro-inverso di Antennapedia: l'internalizzazione del coniugato avviene nel giro di pochi minuti, mentre la penetrazione del non coniugato è sensibilmente più lenta.

1.4.2. Delivery di PNA nel compartimento nucleare

Due fattori sono stati identificati come prerequisiti per una efficace traslocazione nel nucleo: a) un efficiente trasporto del cargo nel citoplasma; b) una sequenza di localizzazione nucleare accessibile e biologicamente

attiva. Il primo punto è già stato ampiamente discusso. Per quanto riguarda il secondo aspetto, molto utili per l'uptake nucleare si sono rivelate le cosiddette sequenze topogeniche.¹⁰³ Sono sequenze peptidiche generalmente brevi e fortemente basiche, costituite da successioni di lisine o arginine interrotte da amminoacidi di altro tipo, spesso neutri ed idrofobici. Tali sequenze sono segnali che vengono riconosciuti e legati da recettori presenti sulla superficie dei pori nucleari, ovvero aperture circolari del diametro di circa 80-90 nm che perforano le membrane interna ed esterna del nucleo in diversi punti. Tali pori svolgono l'importante funzione di lasciar passare liberamente ioni e piccole molecole attraverso la membrana e di regolare selettivamente il trasporto delle molecole più grandi. Dopo il riconoscimento ed il legame, un meccanismo ATP-dipendente spinge la molecola, attraverso il complesso del poro, nell'interno del nucleo. La prima di tali sequenze¹⁰⁴ è stata identificata sulla proteina virale antigene T del virus SV40. Nella tabella che segue (tab. 4) sono riportati alcuni esempi di segnali di localizzazione nucleare.

Tabella 4 Alcuni segnali di localizzazione nucleare

<i>Proteina</i>	<i>Segnale</i>
<i>E1A di adenovirus</i>	KRPRP
<i>Proteina nucleare del virus dell'influenza</i>	PKKAREP
<i>Antigene T di SV40</i>	PKKKRKV
<i>UP1 di SV40</i>	APTKRKGS
<i>Proteina ribosomiale L3 di lievito</i>	PRKR

Per assicurare contemporaneamente un efficiente passaggio attraverso la membrana plasmatica ed altresì un efficace uptake nucleare, Braun e i suoi collaboratori hanno sintetizzato un PNA coniugato sia ad un peptide capace di attraversare la membrana cellulare (pAntp) che ad un peptide NLS come sistema veicolante all'interno del nucleo. L'efficacia di tale costrutto è stata

positivamente testata su cellule umane di carcinoma prostatico: l'ingresso nel citoplasma è visibile appena dopo un'ora e lo diventa nel nucleo già dopo tre ore.¹⁰⁵

Riassumendo, quanto detto per il delivery di PNA può essere schematicamente rappresentato con la seguente figura (fig. 11):

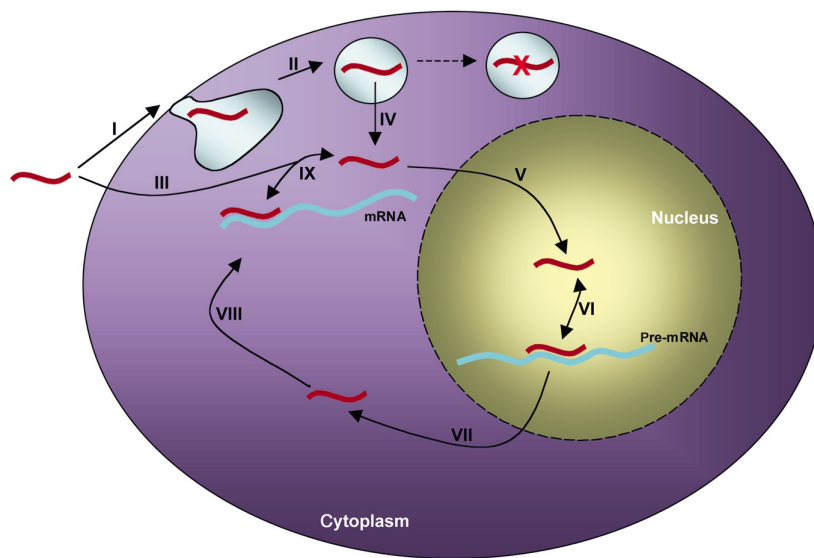


Fig. 11 *Delivery di PNA. (I) L'oligonucleotide interagisce con la superficie cellulare con modalità differente a seconda che sia inviato tal quale o coniugato con specifici vettori. (II) L'oligonucleotide subisce endocitosi e viene pertanto sequestrato dal resto del citoplasma. In alternativa (III), l'oligonucleotide può entrare in cellula con un meccanismo di tipo non-endocitotico e legare direttamente (IX) l'mRNA target, oppure (IV) fuoriuscire dall'endosoma e legare direttamente (IX) l'mRNA target, ma può anche rimanervi sequestrato e subire degradazione ad opera dei lisosomi (freccia tratteggiata). (V) Una volta libero nel citoplasma, può diffondere passivamente nel nucleo, dove (VI) va ad ibridizzare con il pre-mRNA target. (VII) Tramite il sistema delle esportine, l'oligonucleotide può uscire dai complessi nucleari del poro e legare (VIII) l'mRNA citoplasmatico. (IX) L'oligonucleotide può dissociare dall'RNA target e riprendere il ciclo.*

In conclusione, ad oggi non esiste un peptide vettore da poter utilizzare in maniera universale; la scelta vincente sarà il risultato della valutazione di più fattori, quali la natura e dimensioni della molecola da trasportare, la cellula target, le condizioni sperimentali (maneggiamento e crescita delle cellule, natura delle tecniche per i saggi di attività, concentrazione del coniugato), nonché il sito di azione bersaglio (inibizione della trascrizione , correzione dello splicing, arresto della traduzione...).

Obiettivi del lavoro di tesi

Il lavoro di tesi proposto è stato svolto perseguendo i seguenti obiettivi:

1. Sintesi e caratterizzazione di PNA e coniugati per il targeting di geni di interesse biologico, quali il gene della β -globina e il gene TrKA;
2. progettazione e sintesi di nuovi analoghi di PNA, in particolare di PNA con modifiche sullo scheletro pseudopeptidico, al fine di valutare se e in che misura modifiche a livello strutturale abbiano influenza sulle proprietà chimico-fisiche del PNA, vale a dire in termini di migliorata affinità di legame per il bersaglio, aumentata solubilità in acqua, ecc...

Bibliografia

1. a) Zamecknik, P.C.; Stephenson, M.L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1978**, 75, 280-284. b) Stephenson, M.L.; Zamecknik, P.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1978**, 75, 285-288.
2. Uhlmann, E.; Peyman, A. *Chem. Rev.*, **1990**, 90, 543-584.
3. a) Crooke, S.T. *Chem. Ind.*, **1996**, 90-93. b) Matteucci, M.D.; Wagner, R.W. *Nature*, **1996**, 384, 20-22.
4. a) Shid, D.; Park, T.W.; Evans, C.L.; Jagnes, J.M.; Palmenberg, A.C. *J. Virology*, **1987**, 61, 2033-2040. b) Cohen, J.S. *Antivir. Res.*, **1991**, 16, 121-133.
5. Tseng, B.Y.; Brown, K.D. *Cancer Gene Therapy*, **1994**, 1, 65-71.
6. a) Milligean, J.F.; Matteucci, M.D.; Martin, J.C. *J. Med. Chem.*, **1993**, 36, 1923-1937. b) De Mesmaeker, A.; Häner, R.; Martin, P.; Moser, H.E. *Acc. Chem. Res.*, **1995**, 28, 366-374. c) De Mesmaeker, A.; Altmann, K.H.; Waldner, A.; Wendeborn, S. *Curr. Op. Struct. Biology*, **1995**, 5, 343-355. d) Matteucci, M.D. *Pers. Drug Disc. Design*, **1996**, 4, 1-16.
7. a) Eckstein, F. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1983**, 22, 423-439. b) Suska, A.; Grajkowski, A.; Wilk, A. *Pure Appl. Chem.*, **1993**, 65, 707-714.
8. a) Olsen, D.B.; Eckstein, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, 87, 1451-1455. b) Ghosh, M.K.; Ghosh, K.; Dahl, O.; Cohen, J.S.; *Nucl. Acids Res.*, **1993**, 21, 5761-5766.
9. Bjergäde, K.; Dahl, O. *Nucl. Acids Res.*, **1991**, 19, 5843-5850.
10. Stein, C.A.; Cheng, Y.C. *Science*, **1993**, 261, 1004-1012. b) Wagner, R.W. *Nature*, **1994**, 372, 333-335.
11. Gryaznov, S.M.; Chen, J.K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 3143-3144.

12. Skorski, T.; Perrotti, D.; Nieborowska, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, 94, 3966-3971.
13. Jones, R.J.; Lin, K.Y.; Milligan, J.F. *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 2983-2991.
14. Sanghvi, Y.S.; Cook, P.D. in “*Nucleoside and Nucleotides as Antitumor and Antiviral Agents*”, C.K. Chu, Baker, D.C. eds., Plenum Press, New York, **1993**, 311-324.
15. De Mesmaeker, A.; Lesueur, C.; Bevierre M.O. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1996**, 35, 279-2794.
16. Van Aerschot, A.; Verheggen, I.; Hendrix, C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1995**, 34, 1338-1339.
17. Nielsen, P.E.; Egholm, M.; Berg, R.M.; Buchardt, O. *Science*, **1991**, 254, 1497-1500.
18. Jensen, K.K.; Orum, H.; Nielsen, P.E.; Norden, B. *Biochemistry*, **1997**, 36, 5072-5077.
19. Demidov, V.; Frank-Kamenetskii, M.D.; Egholm, M. *Nucl. Acids Res.*, **1993**, 21, 2103-2107.
20. Ray, A.; Nordén, B. *FASEB*, **2000**, 14, 1041-1060.
21. Christensen, L.; Fitzpatrick, R.; Gildea, B. *J. Pept. Sci.*, **1995**, 3, 175-183.
22. Thomson, S.A.; Josey, J.A.; Cadilla, R.; *Tetrahedron*, **1995**, 51, 6179-6194.
23. Egholm, M.; Buchardt, O.; Christensen, L. *Nature*, **1993**, 365, 566-567.
24. Egholm, M.; Buchardt, O.; Nielsen, P.E. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 1895-1897.
25. Egholm, M.; Christensen, L.; Dueholm, K.L. *Nucl. Acids Res.*, **1995**, 23, 217-222.
26. Wittung, P.; Nielsen, P.E.; Nordén, B. *Nucleosides and Nucleotides*, **1997**, 16, 599-602.

27. Brown, S.C.; Thomson, S.A.; Veal, J.M.; Davis, D.G. *Science*, **1994**, 265, 777-780.
28. Eriksson, M.; Nielsen, P.E. *Nature Struct. Biol.*, **1996**, 3, 410-413.
29. Betts, L.; Josey, J.A.; Veal, J.M. *Science*, **1995**, 270, 1838.
30. Rasmussen, H.; Kastrup, J.S.; Nielsen, J.N.; Nielsen, J.M.; Nielsen, P.E. *Nature Struct. Biol.*, **1997**, 4, 98.
31. Haaima, G.; Rasmussen, H.; Schmidt, G. *New J. Chem.*, **1999**, 23, 833-840.
32. Eldrup, A.B.; Nielsen, B.B.; Haaima, G. *Eur. J. Org. Chem.*, **2001**, 9, 1781-1790.
33. Menchise, V.; De Simone, G.; Corradini, R. *Acta Cryst D.*, **2002**, 58, 553.
34. Menchise, V.; De Simone, G.; Tedeschi, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, 100, 12021-12026.
35. Leijon, M.; Greaslund, A.; Nielsen, P.E.; Buchardt, O.; Nordèn, B.; Kristensen, S.M.; Eriksson, M. *Biochemistry*, **1994**, 33, 9820-9825.
36. a) Haaima, G.; Lohse, A.; Buchard, O.; Nielsen, P.E. *Angew. Chem.*, **1996**, 108, 2068-2070. b) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1996**, 35, 1939-1941.
37. Sforza, S.; Corradini, R.; Ghirardi, S.; Dossena, A.; Marchelli, R. *Eur. J. Org. Chem.*, **2000**, 2905-2913.
38. Sforza, S.; Tedeschi, T.; Corradini, R.; Dossena, A.; Marchelli, R. *Chem Comm.*, **2003**, 1102-1103.
39. Dwain, ; Braasch, ; Corey. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 4503-4509.
40. Knudsen, H.; Nielsen, P.E. *Anti-Cancer Drugs*, **1997**, 8, 113.
41. Good, L.; Nielsen, P.E. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*, **1997**, 7, 431.
42. Knudsen, H.; Nielsen, P.E. *Nucleic Acids Res.*, **1996**, 24, 494.
43. Pooga, M.; Land, T.; Bartfai, T. *Biomol. Eng.*, **2001**, 17, 183.
44. Nielsen, P.E. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **2000**, 2, 282.

- 45.Soomets, U.; Halbrink, M.; Langel, U. *Front. Biosci.*, **1999**, 4, 782-786.
- 46.Verheijen, J.C.; Bayly, S.F.; Player, M.R. *Nucleosides Nucleotides*, **1999**, 18, 1485.
- 47.Fraser, G.L.; Holmgren, J.; Clarke, P.B. *Mol. Pharmacol.*, **2000**, 57, 725.
- 48.Doyle, D.F.; Braasch, D.A.; Simmons, C.G. *Biochemistry*, **2001**, 40, 53.
- 49.Karras, J.G.; Maier, M.A.; Lu, T.; Watt, A.; Manoharan, M. *Biochemistry*, **2001**, 40, 7853-7859.
- 50.Mologni, L.; Marchesi, E.; Nielsen, P.E. *Cancer Res.*, **2001**, 61, 5468.
- 51.Good, L.; Nielsen, P.E. *Nature Biotech.*, **1998**, 16, 355.
- 52.Adlerz, L.; Soomets, U.; Holmlund, L. *Neurosci. Lett.*, **2003**, 336, 55.
- 53.Bentin, T.; Nielsen, P.E. *Biochemistry*, **1996**, 35, 8863-8869.
- 54.Cutrona, G.; Carpaneto, E.M.; Ulivi, M.; Roncella, S.; Landt, O.; Ferrarini, M.; Boffa, L.C. *Nature Biotechnol.*, **2000**, 18, 300-303.
- 55.Boffa, L.C.; Scarfi, S.; Mariani, M.R. *Cancer Res.*, **2000**, 60, 2258.
- 56.Mc Mahon, BH, Stewart, J.A.; Bitter, M.D.; Fauq, A. *Life Sci.*, **2002**, 71, 325.
- 57.Tonelli, R.; Fronza, R.; Purgato, S. *Mol. Canc. Therapeutics*,
- 58.Mollegaard, N.E., Buchardt, O.; Egholm, M.; Nielsen, P.E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, 91, 3892-3895.
- 59.Gambari, R. *Current Drug Targets*, **2004**, 419, 430.
- 60.Uhlmann, E. *Biol. Chem.*, **1998**, 379, 1045.
- 61.Romanelli, A.; Pedone, C.; Saviano, M.; Bianchi, N.; Borgatti, M.; Mischianti, C.; Gambari, R. *Eur. J. Biochem.*, **2001**, 268, 6066.
- 62.Veselkov, A.G.; Demidov, V.; Nielsen, P.E.; Frank-Kamenetskii, M.D. *Nucleic Acids Res.*, **1996**, 24, 2483-2487.
- 63.Perry-O'Keefe, H.; Yao, X.W.; Coull, J.M.; Fuchs, M.; Egholm, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, 93, 14670-14675.
- 64.Orum, H.; Nielsen, P.E.; Jorgensen, M. *Bio Technique*, **1995**, 19, 472-480.

65. Nielsen, P.E. *Current Opinion in Biotechnology*, **1999**, 10, 71.
66. Ørum, H.; Nielsen, P.E.; Egholm, M.; Berg, R.H.; Buchardt, O.; Stanley, C. *Nucleic Acid Res*, **1993**, 21, 5332.
67. Kyger, E.M.; Krevolin, M.D.; Powell, M.J. *Anal Biochem*, **1998**, 260, 142.
68. Igloi, G.L. *Biotechniques*, **1999**, 27, 798.
69. Griffin, T.J.; Tang, W.; Smith, L.M. *Nature Biotech*, **1997**, 15, 1368.
70. Wang, J.; Rivas, G.; Cai, X.; Chicharro, M.; Parrado, C.; Dontha, N.; Begleiter, A.; Mowat, M.; Palecek, E.; Nielsen, P.E. *Anal Chim Acta*, **1997**, 344, 111.
71. Wang, J. *Biosensors & Bioelectron*, **1998**, 13, 757.
72. Wang, J.; Nielsen, P.E.; Jiang, M.; Cai, X.; Fernandes, J.R.; Grant, D.H.; Ozsoz, M.; Beglieter, A.; Mowat, M. *Anal Chem*, **1997**, 69, 5200.
73. Kuhn, H.; Demidov, V.V.; Coull, J.M.; Fiandaca, M.J.; Gildea, B.D.; Frank-Kamenetskii, M.D. *J Am Chem Soc*, **2002**, 124, 1097.
74. Svanvik, N.; Nygren, J.; Westman, G.; Kubista, M. *J Am Chem Soc*, **2001**, 123, 803.
75. Jensen, K.K.; Orum, H.; Nielsen, P.E.; Nordén, B. *Biochemistry*, **1997**, 36, 5072.
76. Sawata, S.; Kai, E.; Ikebukuro, K.; Iida, T.; Honda, T.; Karube, I. *Biosens Bioelect*, **1999**, 14, 397.
77. Feriotto, G.; Corradini, R.; Sforza, S.; Mischiati, C.; Marchelli, R.; Gambari, R. *Lab Inv*, **2001**, 81, 1415.
78. Corradini, R.; Feriotto, G.; Sforza, S.; Marchelli, R.; Gambari, R. *J Mol Recognit*, **2004**, 17, 76-84.
79. Englund, E.A.; Appella, D.H. *Organic Letters*, **2005**, 7, 3465-3467.80.
80. Mischel, P.S.; Cloughesy, T.F.; Nelson, S.F. *Nature Reviews Neuroscience*, **2004**, 5, 782-792.
81. Chittur, S.V.; *Comb chem high throughput scr*, **2004**, 7, 531-537.

82. Germini, A.; Mezzelani, A.; Lesignoli, F.; Corradini, R.; Marchelli, R.; Bordoni, R.; Consolandi, C.; De Bellis, G.; *J Agr Food Chem*, **2004**, 52, 4535-4540.
83. Brandt, O.; Hoheisel, J.D. *Trends in Biotechnol*, **2004**, 22, 617-622.
84. Weiler, J.; Gausepohl, H.; Hauser, N.; Jensen, O.N.; Hoheisel, J.D.; *Nucleic Acids Res*, **1997**, 25, 2792-2799.
85. Hyrup, B.; Nielsen, P.E.; *Bioorg. Med. Chem*, **1996**, 4, 5-23.
86. Koppelhus, U.; Nielsen, P.E. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2003**, 55, 267-280.
87. Wittung, P.; Nielsen, P.E.; Norden, B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 7049.
88. Faruqi, A.F.; Egholm, M.; Blazer, P.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, 95, 1398-1403.
89. Fisher, T.L.; Terhorst, T.; Cao, X.; Wagner, R.W. *Nucleic Acids Res.*, **1993**, 21, 3857-3865.
90. a) Bergan, R.; Connell, Y.; Fahmy, B.; Neckers, L. *Nucleic Acids Res.*, **1993**, 21, 3567-3573. b) Liu, Y.; Bergan, R. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **2001**, 11, 7-14.
91. a) Nielsen, P.E. *Export Opin. Invest. Drugs*, 2001, 10, 331-341. b) Sei, S.; Yang, Q.E.; O'Neil, D. *J. Virol.*, **2000**, 74, 4621-4633.
92. Lebedeva, I.; Benimetskaya, L.; Stein, C.A.; Vilenchik, M. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2000**, 50, 101-119.
93. Mann, D.A.; Frankel, A.D. *EMBO J.*, **1991**, 10, 1733-1739.
94. Jolit, A.; Pernelle, C.; Deagostini-Bazin, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991**, 88, 1864-1868.
95. a) Derossi, D.; Joliot, A.H.; Chassaing, O. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 10444-10050. b) Vivés, E.; Brodin, P.; Lebleu, B. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 16010-16017.

96. Simmons, C.O.; Piffs, A.E.; Mayfield, L.D.; Shay, J.W.; Corey, D.R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, 7, 3001-3006.
97. Lindgren, M.; Hällbrink, M.; Prochiantz, A. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2000**, 21, 99-103.
98. Langel, U. *Cell-Penetrating Peptides, Processes and Applications*, CRC Press., ed. **2002**.
99. a) Scarfi, S.; Giovine, M.; Millo, E.; Benatti, U. *Minerva Biotechnologia*, **1999**, 11, 221. b) Scarfi, S.; Gasparini, A.; Damonte, G.; Benatti, U. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **1997**, 236, 323.
100. Bersin, T. *Handbuch der Enzymologie*, F.F. Nord and R. Weidenhagen Eds, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, **1940**, 599.
101. a) Goodman, M.; Chorev, M. *Acc. Chem. Res.*, **1997**, 12, 1. b) Aldrian-Herrada, G.; Desarmenien, M.G.; Orcel, H. *Nucleic Acids Res.*, **1998**, 26, 4910. c) Krotz, A.H.; Buchardt, O.; Nielsen, P.E. *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 6941-6944.
102. Jameson, B.A.; McDonnel, N.M.; Marini, J.C. *Nature*, **1994**, 368, 744.
103. Blobel, G. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **1995**, 60, 1-10.
104. Cartier, R.; Reszka, R. *Gene Therapy*, **2002**, 9, 157-167.
105. Braun, K.; Peschke, P.; Pipkorn, R. *J. Mol. Biol.*, **2002**, 318, 237-243.

CAPITOLO 2

2.1. Sintesi e caratterizzazione di PNA per il targeting di geni di interesse biologico

Un primo importante obiettivo di questo lavoro di tesi è stata la sintesi di nuovi analoghi oligonucleotidici progettati quali agenti antisenso in grado di interagire specificamente con opportune sequenze dell'mRNA di geni target, quali il gene della β -globina ed il gene TrKAIII. Grazie alla loro elevata affinità verso l'RNA e alla capacità di discriminare mismatch, infatti, i PNA sono interessanti molecole con potenziali applicazioni antisenso. Inoltre, il meccanismo d'azione con cui esplicano la loro attività antisenso non è mediato dall'enzima ribonucleasi H, per cui possono essere proficuamente impiegati quando l'mRNA target non deve essere degradato, ma riparato, come desiderato nel processo di modulazione dello splicing.

Lo splicing riveste un ruolo centrale nella regolazione dell'espressione genica. Questo è indicato anche dal fatto che circa il 70% dei geni umani subiscono eventi di splicing.

Il meccanismo dettagliato con cui avviene tale processo è abbastanza complesso. In breve, quando il DNA è trascritto nell'RNA, si forma dapprima il pre-mRNA, che è costituito da tratti codificanti, detti esoni, alternati ad altri tratti che non codificano, detti introni. Quando si trova ancora nel nucleo, il

pre-mRNA viene sottoposto ad un processo di “taglia e cuci” (splicing) nel corso del quale gli introni sono rimossi e gli esoni vengono uniti l'uno all'altro a formare una sequenza continua. Per generare degli mRNA corretti gli esoni devono essere identificati e uniti assieme in modo preciso; il processo richiede l'azione coordinata di una serie di piccole particelle ribonucleoproteiche (snRNPs), le quali, assieme ad altre proteine addizionali, formano lo spliceosoma. Le sequenze di basi in corrispondenza delle giunzioni introne-esone hanno un motivo strutturale comune: la sequenza delle basi di un introne inizia con GU e termina con AG. La sequenza di consenso all'estremità 5' degli introni è AGGUAAGU. All'estremità 3' degli introni la sequenza di consenso è un tratto di 10 pirimidine (U e C), seguito da una base qualunque, poi da C ed infine da AG, che è invariante. Gli introni hanno anche un sito interno importante che si trova da 20 a 50 nucleotidi a monte del sito di splicing 3'; questo sito prende il nome di sito di *branch* (ramificazione). Nel lievito, la sequenza del sito di ramificazione è quasi sempre UACUAAC, mentre nei mammiferi si trova una varietà di sequenze diverse, ma la caratteristica comune a tutte è la presenza di almeno un residuo di A (fig. 1).

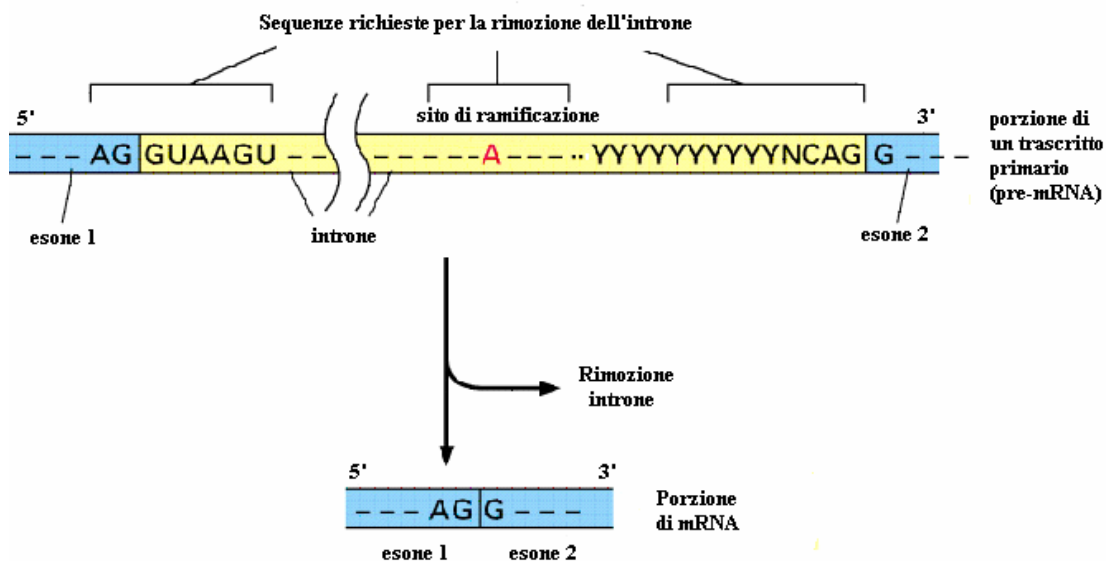


Fig. 1 Segnali di splicing. Le sequenze riportate sono le sequenze di consenso per i siti di splicing 5' e 3'.

Lo splicing inizia con il taglio del legame fosfodiesterico fra l'esone a monte (esone 1) e l'estremità 5' dell'introne. Si tratta di una reazione di transesterificazione, in cui il gruppo attaccante è l'OH in posizione 2' della adenina (A) situata nel punto di ramificazione (fig. 2). Si forma, dunque, un legame fosfodiesterico 2', 5' fra questo residuo di A ed il fosfato all'estremità 5' dell'introne. Ricordando che il residuo di A è comunque unito ad altri 2 nucleotidi da normali legami fosfodiesterei 3', 5', si viene a generare una ramificazione e si forma un intermedio a forma di cappio (di qui il nome sito di *branch*). A questo punto, il gruppo OH appena prodotto all'estremità 3' dell'esone a monte attacca il legame fosfodiesterico fra l'introne e l'esone a valle. I due esoni vengono così uniti e l'introne viene rilasciato sempre in forma di cappio (fig. 2).

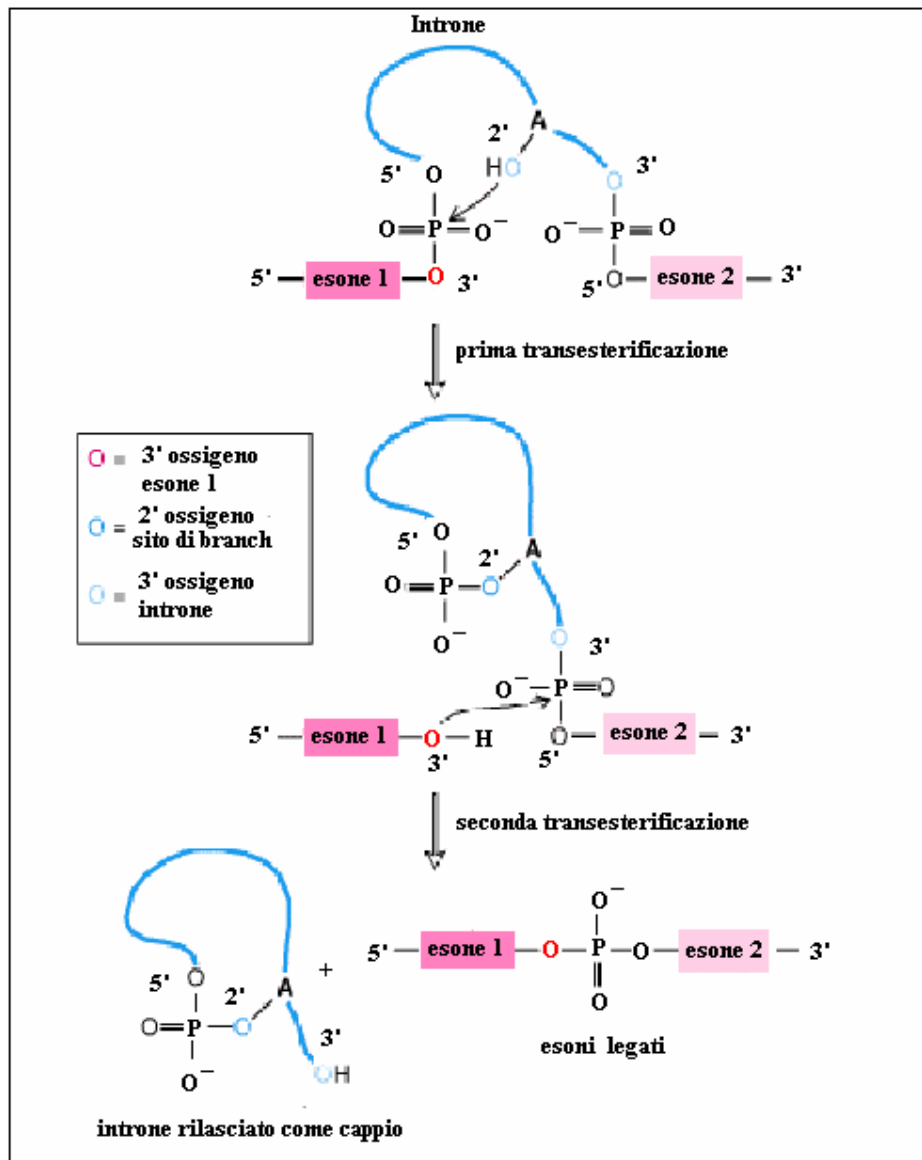


Fig. 2 Meccanismo di splicing del pre-mRNA.

Il pre-mRNA di diversi geni può andare incontro a splicing alternativo, in cui possono variare il numero e la localizzazione degli introni rimossi. In conseguenza dello splicing alternativo, uno stesso segmento di DNA può fungere da introne o da esone, a seconda che venga mantenuto o rimosso durante la maturazione. In altre parole, lo splicing alternativo espande la capacità codificante del genoma producendo RNA messaggeri differenti a

partire da un unico trascritto genico primario e questo comporta in generale una diversità di proteine rispetto ad un numero relativamente limitato di geni trascritti (fig. 3).

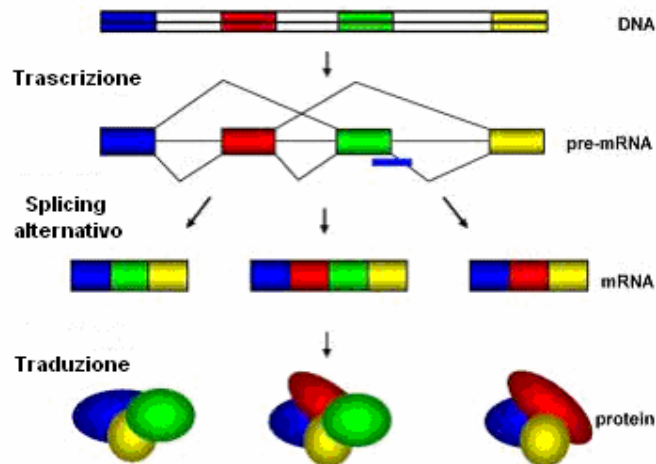


Fig. 3 Splicing alternativo del pre-mRNA. I riquadri colorati rappresentano gli esoni, quelli bianchi gli introni. In seguito a splicing alternativo, si ha la produzione di differenti proteine da un singolo pre-mRNA.

Sebbene lo splicing alternativo sia necessario per lo sviluppo normale, le sue aberrazioni sono anche implicati in numerose forme patologiche, come nel caso della talassemia, del cancro e di disordini neurodegenerativi.¹ Pertanto, approcci in grado di intervenire sul meccanismo dello splicing per alterarne il *pathway* possono essere di alto valore terapeutico. Considerando che nella maggior parte dei casi di splicing aberrante i corretti siti di splice continuano ad essere funzionali, mentre si attivano all'interno dell'introne nuovi siti di taglio, un utile approccio terapeutico può derivare dall'uso di oligonucleotidi sintetici antisenso.² Bloccando, infatti, i siti di splice non corretti con molecole antisenso, si dirige lo splicing verso i corretti siti di splice, generando così un mRNA di nuovo in grado di codificare per proteine

aventi sequenza amminoacidica corretta. Tali molecole sono per questo anche definite *splice switching oligonucleotides* (SSO)³ (fig. 4).

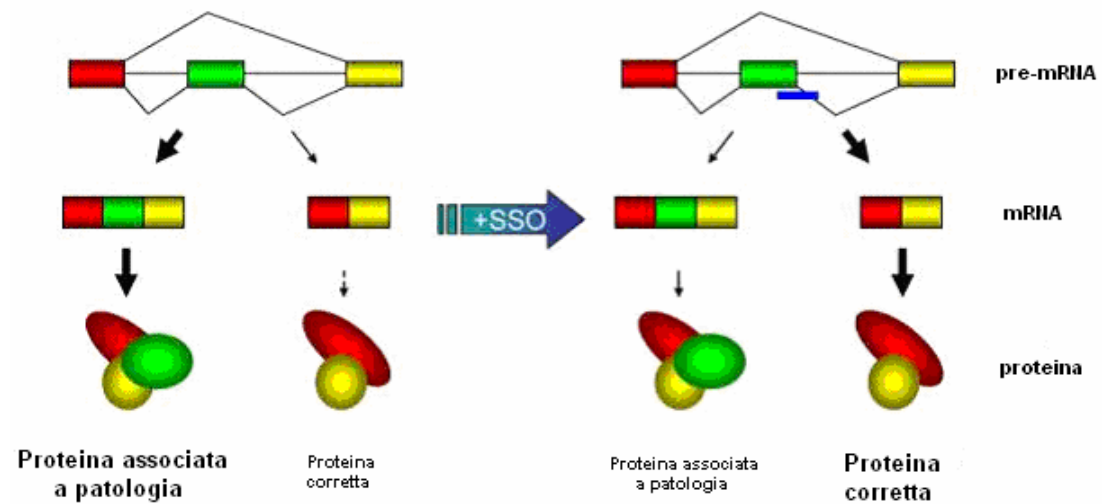


Fig. 4 Deregolazione dello splicing alternativo e successiva correzione medinte uno splice switching oligonucleotide (SSO). Il livello di espressione della proteina associata a patologia viene sensibilmente ridotto a favore dell'isoforma corretta.

Oggetto della prima parte del presente lavoro di tesi è stata la sintesi di PNA e coniugati PNA-peptide finalizzati al raggiungimento dei seguenti obiettivi:

- 1- Regolazione dello splicing alternativo a carico di un tratto mutato del gene della β -globina;
- 2- studio dello splicing alternativo nei tumori. Inibizione di un oncogene (TrKAIII) originato in seguito a splicing aberrante.

2.1.a Gene β -globina

L'emoglobina è una grossa proteina contenuta all'interno dei globuli rossi la cui funzione è quella di catturare l'ossigeno dai polmoni e trasportarlo nei diversi tessuti. È costituita da quattro subunità globulari, due dette di tipo alfa e due di tipo beta. Difetti in una o più di queste catene sono causa di talassemia. La forma più diffusa in Italia e nell'area mediterranea è la beta-talassemia o anemia mediterranea, provocata da un'alterazione della catena globinica di tipo beta.⁴ A causa della produzione difettosa di catene beta, le catene alfa si uniscono e formano degli aggregati che danneggiano la membrana del globulo rosso. Ne deriva la distruzione precoce dei precursori dei globuli rossi nel midollo e, in misura minore, la loro distruzione nella milza. Quando entrambe le copie (materna e paterna) del gene della catena beta dell'emoglobina sono difettose si ha la talassemia major, o morbo di Cooley, che si manifesta verso il quarto-sesto mese di vita. L'assenza totale delle catene beta porta ad una grave anemia e a modificazioni scheletriche, perché il midollo osseo, dove vengono prodotti i globuli rossi, aumenta di volume per cercare di compensare la perdita. I globuli rossi che vengono prodotti sono però poveri di emoglobina e vengono presto distrutti a causa dell'accumulo di catene alfa, causando ingrossamento della milza. Se non viene curata, la talassemia major può portare alla morte fra i 3 e i 6 anni di vita. La talassemia intermedia è una forma attenuata di talassemia, che si manifesta in modo estremamente variabile in individui omozigoti. I sintomi più tipici sono anemia, ingrossamento della milza, calcolosi biliare ed ulcere malleolari.

La terapia classica per la talassemia major consiste in ripetute trasfusioni. Queste, però, provocano un accumulo di ferro nel sangue che bisogna eliminare con una terapia a base di farmaci detti chelanti, che sequestrano ed eliminano il ferro, come la deferoxamina B, che viene somministrata tramite

lunghe e ripetute infusioni (fino a 12 ore al giorno). Oggi esiste anche un chelante orale (diferipone) che sembra dare risultati promettenti. Per la talassemia intermedia, il trattamento è sintomatico. Le trasfusioni non sono necessarie. Utile è la somministrazione di acido folico. Un farmaco chiamato idrossiurea, sperimentato di recente, ha dato occasionalmente risultati positivi, ma può dare effetti collaterali anche gravi. E' stato tentato l'uso di questo farmaco per curare anche la talassemia major, ma i risultati sono stati nulli. Il trapianto di midollo, attualmente, è l'unica cura che può portare alla guarigione definitiva per le persone affette da talassemia major. Il problema maggiore del trapianto di midollo è la necessità di identificare donatori compatibili, di solito fratelli o sorelle del paziente. Le ragioni per cui alcuni individui omozigoti manifestano la talassemia major ed alcuni la talassemia intermedia sono diverse. Una ragione può essere il tipo di alterazione genetica. Si conoscono, infatti, più di 200 mutazioni di questo gene che causano una beta talassemia: quelle che provocano lo splicing aberrante sono le più comuni.⁵ La capacità di oligonucleotidi sintetici di bloccare il processo di splicing aberrante e ripristinare lo splicing corretto dell'mRNA è stato dimostrato in diversi casi, ad esempio su mutazioni nell'introne 1 a carico del nucleotide 110 (IVS1-110)⁶ e nell'introne 2 a livello dei nucleotidi 654, 705 e 745 (IVS2-654, IVS2-705 e IVS2-745).⁷ Queste mutazioni attivano siti di splicing alternativi negli introni e quindi provocano la produzione di un mRNA non corretto e l'abolizione della traslazione delle proteine β globine corrette. Requisito fondamentale affinché un oligonucleotide antisense ripari e/o corregga le mutazioni negli introni è che esso non promuova il taglio dell'RNA bersaglio da parte della RNasi H e si accumuli nel nucleo cellulare, che è il sito dello splicing dell'RNA. Inoltre, deve essere in grado di competere efficacemente con i fattori di splicing per l'accesso al pre-mRNA target. Vari tipi di ON modificati soddisfano a tali criteri. Ad esempio,

oligonucleotidi con modificazioni in corrispondenza della posizione 2', come i 2'-O-metili, 2'-O-metossietili e 2'-O-amminopropili, oppure con modificazioni sul backbone come i morfolino-derivati, i PNA, i fosforamidati ed i metilfosfonati, possiedono tali caratteristiche.² Un mRNA per la beta-globina è stato corretto in cellule eritroidi da topi transgenici contenenti il gene per la beta-globina con la mutazione di splicing IVS2-654 e da pazienti talassemici con genotipo IVS2-654/beta(E). Questo è stato ottenuto attraverso uptake di morfolino-derivati per il sito aberrante di splicing presente a livello della posizione 652 dell'introne 2 del pre-mRNA. In condizioni ottimali di uptake, il massimo livello di mRNA per le beta-globine e di emoglobina A nelle cellule eritroidi dei pazienti è stato, rispettivamente, del 77 e 54%.⁵

In questo contesto si inserisce questo lavoro, che prevede la sintesi di molecole antisense costituite da oligomeri di PNA e coniugati PNA-peptide con sequenza complementare ad una regione mutata dell'introne 1 del gene della β globina (IVS1-110). Nell'introne 1 in corrispondenza del nucleotide 110 è stata rinvenuta una mutazione puntiforme che ha portato alla sostituzione di una guanina con una adenina, con conseguente attivazione di un sito criptico di splice 3'. Pur in presenza del corretto sito di splice 3', il meccanismo di splicing utilizza preferenzialmente quello aberrante, con produzione di un mRNA "difettoso" che ritiene 19 nucleotidi dell'introne. È stato riscontrato che nel pre-mRNA del gene della β globina recante la mutazione in posizione 110 (pre-mRNA β^{110}) il sito di splice aberrante 3' (in corrispondenza del nucleotide 111) utilizza il corretto sito di *branch* localizzato in posizione 94 dell'introne, competendo con il sito di splice corretto e contrastando, di conseguenza, il corretto splicing⁸ (fig. 5).

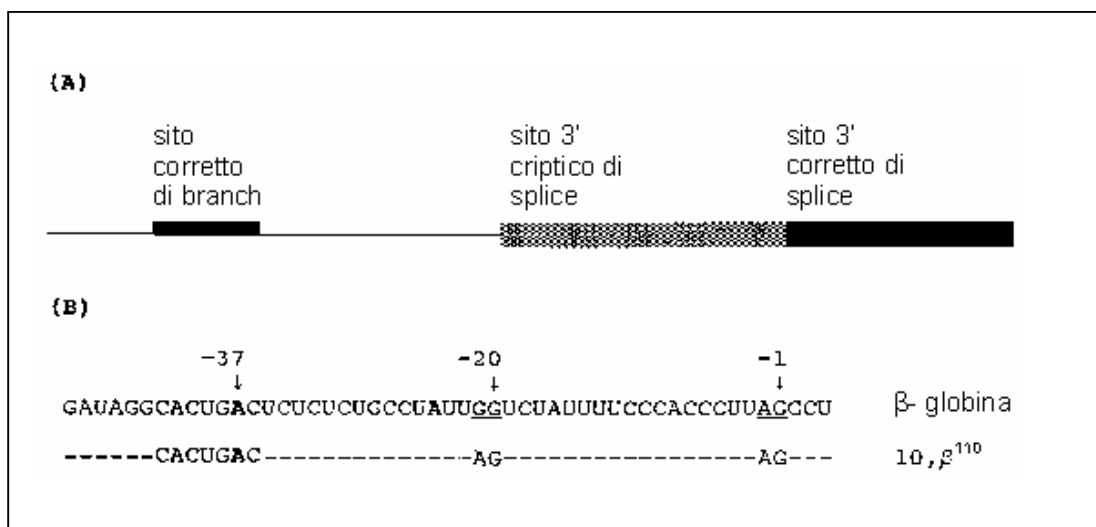


Fig. 5 (A) Rappresentazione schematica delle posizioni relative del sito di branch e dei due siti 3' di splice sulla sequenza di RNA mostrata in B. (B) Corrispondenti sequenze del pre-mRNA del gene wild-type della β globina (riga in alto) e del mutato. I numeri sulla sequenza wild-type indicano le distanze, in termini di nucleotidi, del sito di branch e del sito 3' criptico di splice dal corretto sito 3' di splice.

Pertanto, il sito 3' di splice aberrante che si attiva a livello del nucleotide 111 figura come un ovvio target ai fini della regolazione del pathway di splicing. Bloccare questa regione dovrebbe, di fatto, essere la via più immediata per forzare la macchina di splicing ad utilizzare il sito di splice corretto. La sequenza di PNA sintetizzata è stata pertanto scelta in modo tale da essere complementare al tratto 104-117 dell'introne 1 del gene umano mutato della β globina ed è di seguito riportata (PNA110):

PNA110 H- AATAGACTAATAGG-NH₂

Al fine di aumentare l'uptake cellulare del PNA, quest'ultimo è stato coniugato ad un peptide carrier (PNA110/NLS).

PNA110/NLS H- AATAGACTAATAGG- KPKKKRKV-NH₂

E' stata utilizzata per entrambe le molecole una strategia di sintesi in fase solida. Tale strategia fu introdotta originariamente da Merrifield nel 1963

per la sintesi di peptidi ed oggi è ampiamente utilizzata per la sintesi di molti polimeri biologici, quali oligonucleotidi, peptidi, oligosaccaridi e acidi peptidonucleici. La tecnica consiste nel legare il primo residuo della catena ad un supporto solido insolubile (che funge da gruppo protettore per l'estremità 3' nel caso degli oligo e del C terminale nel caso dei peptidi e dei PNA) e nel sintetizzare il polimero *step by step* (mediante accoppiamento sequenziale) in direzione 3'→5' per gli oligo e C → N terminale per peptidi e PNA, aggiungendo ad ogni stadio il residuo previsto. Terminata la sintesi, l'oligomero è rimosso dalla resina mediante un appropriato trattamento.

Il vantaggio più rimarchevole di questa procedura è che la purificazione può essere effettuata dopo ciascun ciclo di sintesi semplicemente lavando la resina con un solvente opportuno, per cui è possibile usare grandi eccessi di reagenti per spingere le reazioni a completezza. Data poi la ripetitività delle operazioni previste per condensare un residuo all'altro, risulta possibile automatizzare il processo con un notevole risparmio di tempo ed una più elevata riproducibilità.

Dal punto di vista chimico la formazione di un legame peptidico prevede una reazione di condensazione tra la funzione amminica libera di un amminoacido (o monomero di PNA) e la funzione carbossilica libera di un secondo amminoacido (o monomero di PNA). La reazione di formazione di tale legame ammidico prevede l'attivazione del gruppo carbossilico. Nel frattempo, per evitare reazioni collaterali che porterebbero a rese basse o nulle, l'amminoacido da legare deve avere la funzione α -amminica protetta in maniera "temporanea". Inoltre, gli eventuali gruppi funzionali presenti sulle catene laterali devono essere anch'essi protetti per evitare che possano interferire nella reazione di condensazione. I gruppi in catena laterale devono essere stabili nelle condizioni di deprotezione della funzione α -amminica, ma facilmente rimovibili nella procedura di distacco finale del peptide dalla

resina. Dopo aver legato mediante il gruppo COOH il primo amminoacido alla resina, si procede ad ogni ciclo di sintesi effettuando una serie di passaggi che possono essere schematizzati come segue (fig. 6):

1. rimozione del gruppo protettore sull' NH_2 dell'ultimo residuo inserito nella sequenza;
2. lavaggio accurato della resina;
3. attivazione del COOH del residuo che deve reagire;
4. reazione di condensazione;
5. lavaggio accurato della resina;
6. distacco dalla resina.

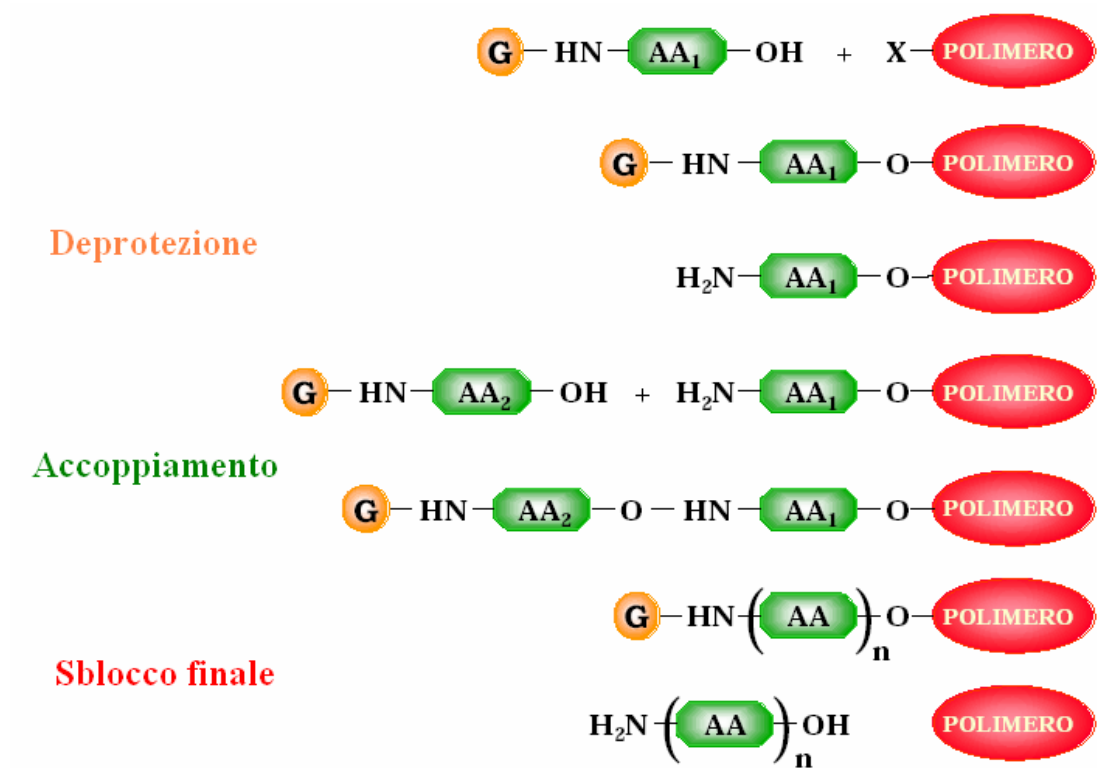


Fig. 6 Rappresentazione schematica della sintesi in fase solida. G = gruppo protettore; AA = amminoacido.

La stessa strategia può ovviamente essere utilizzata anche per la sintesi di sistemi misti, quali ad esempio coniugati PNA-peptide. Bisogna innanzitutto scegliere un supporto solido che sia stabile meccanicamente e si rigonfi egualmente bene durante la sintesi sia dei PNA che dei peptidi e che consenta inoltre il distacco dell'oligomero in condizioni che non danneggiano il coniugato. Il supporto che si è utilizzato è una resina costituita da un copolimero di polistirene e polietilenglicole PAL-PEG; tale supporto è comunemente utilizzato per la sintesi di carbossiammidi. Il legame del primo residuo alla resina è mediato da un linker di PAL: acido Fmoc-amminometil-3,5-dimetossifenossi valerico (figura 7).

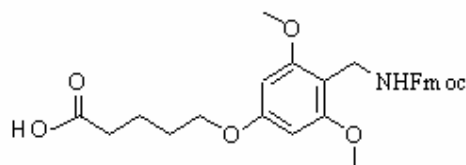


Fig. 7 PAL linker: acido Fmoc-amminometil-3,5-dimetossifenossi valerico.

La strategia di sintesi che è stata eseguita è quella cosiddetta Fmoc, che utilizza, in pratica, come gruppo protettore temporaneo per la funzione amminica terminale dell'amminoacido e del PNA il gruppo 9-fluorenilmetossicarbonile (Fmoc), rimovibile in modo quantitativo per trattamento con piperidina (fig. 8).

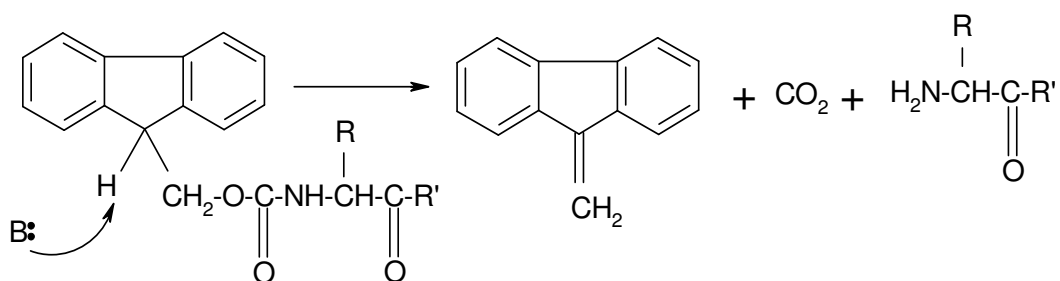


Fig. 8 Meccanismo di β -eliminazione per la rimozione del gruppo protettore temporaneo Fmoc sulla funzione amminica terminale.

I gruppi protettori permanenti sulle funzioni amminiche esocicliche delle nucleobasi e sulle catene laterali degli amminoacidi devono, invece, essere stabili durante il corso della sintesi del coniugato e rimuovibili, pertanto, in condizioni acide. Per il distacco dalla resina e la deprotezione delle catene laterali si utilizza, infatti, una miscela di acido trifluoroacetico (TFA) e scavengers, quali silani. Tali reagenti “bloccano” le specie altamente reattive, generalmente carbocationi, che si formano durante la deprotezione delle catene laterali dei residui amminoacidici e delle funzioni amminiche esocicliche delle nucleobasi. In particolare, i gruppi amminici esociclici delle nucleobasi sono protetti con gruppi benzidrilossicarbonile (Bhoc); le protezioni sulle catene laterali degli amminoacidi prevedono gruppi t-butossicarbonile (Boc) sulla catena laterale della lisina e 2,2,4,6,7-pentametildiidrobenzofuran-5 sulfonile (Pbf) sul gruppo guanidinio dell'arginina (figura 9).

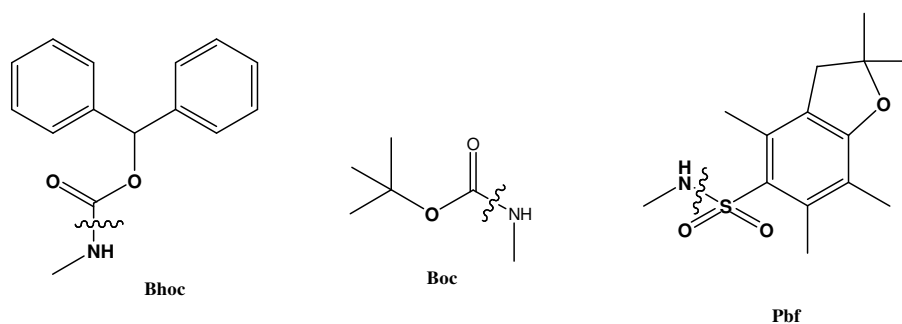


Fig. 9 Rappresentazione dei gruppi protettori permanenti.

Il PNA è stato sintetizzato in fase solida, su un sintetizzatore automatico di PNA/DNA utilizzando protocolli standard per la sintesi Fmoc in fase solida dei PNA su scala 2 μ Mol. I protocolli prevedono cicli ripetitivi di deprotezione del gruppo amminico N-terminale (Fmoc) mediante trattamento con soluzioni di piperidina al 20% in dimetilformammide, accoppiamento del monomero mediato da HATU in presenza di basi quali DIPEA e 2,6 lutidina e acetilazione. Per migliorare le rese di sintesi sono stati eseguiti doppi accoppiamenti su tratti polipurinici. E' riportato infatti che l'ingombro sterico dei residui di A e G riduce l'efficienza dell'accoppiamento in tratti del tipo AA o GG. Al termine della sintesi, il trattamento con TFA/m-cresolo 4/1 (v/v) a temperatura ambiente consente contemporaneamente il distacco della catena oligomerica dalla resina e la rimozione dei gruppi Bhoc dalle nucleobasi. L'oligomero è stato precipitato con etere a freddo ed analizzato mediante HPLC analitico in fase inversa. La purificazione è stata eseguita mediante HPLC in fase inversa su scala semipreparativa. Il prodotto purificato è stato analizzato mediante spettrometria di massa MALDI-TOF e spettroscopia UV-visibile. Il PNA come atteso è caratterizzato da un massimo a 260 nm, dovuto alle basi eterocicliche e un massimo a 210 nm, ascrivibile ai legami peptidici presenti. Di seguito è riportato lo spettro di massa a conferma dell'identità del prodotto sintetizzato (fig. 10).

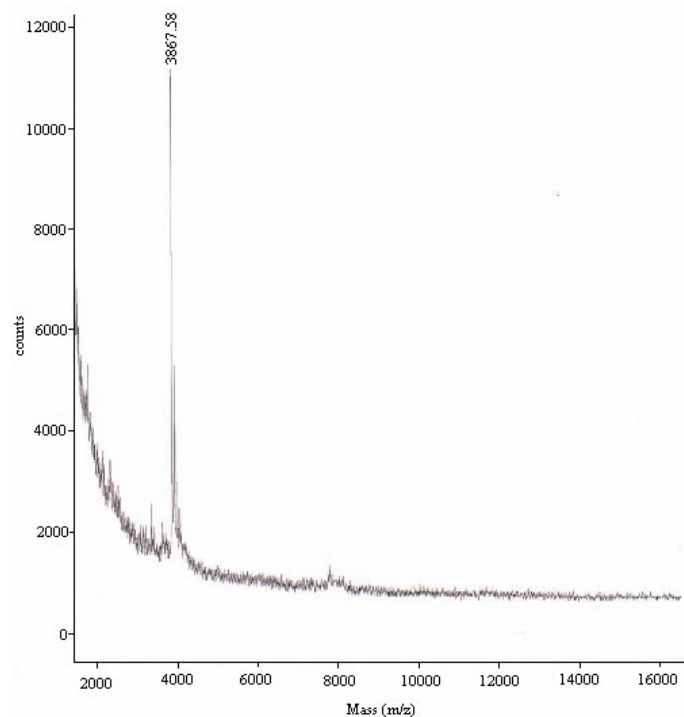


Fig. 10 Spettro Maldi del PNA110.

Successivamente è stato sintetizzato il coniugato PNA-peptide (PNA110/NLS).

Esistono diversi metodi per coniugare PNA a peptidi; la coniugazione può essere eseguita all'estremità C o N-terminale in fase solida, sintetizzando il peptide e facendo crescere la catena di PNA sul supporto funzionalizzato con il peptide, oppure, al contrario, ancorando il PNA alla resina e facendo crescere la catena peptidica sul PNA^{9,10} (fig. 11).

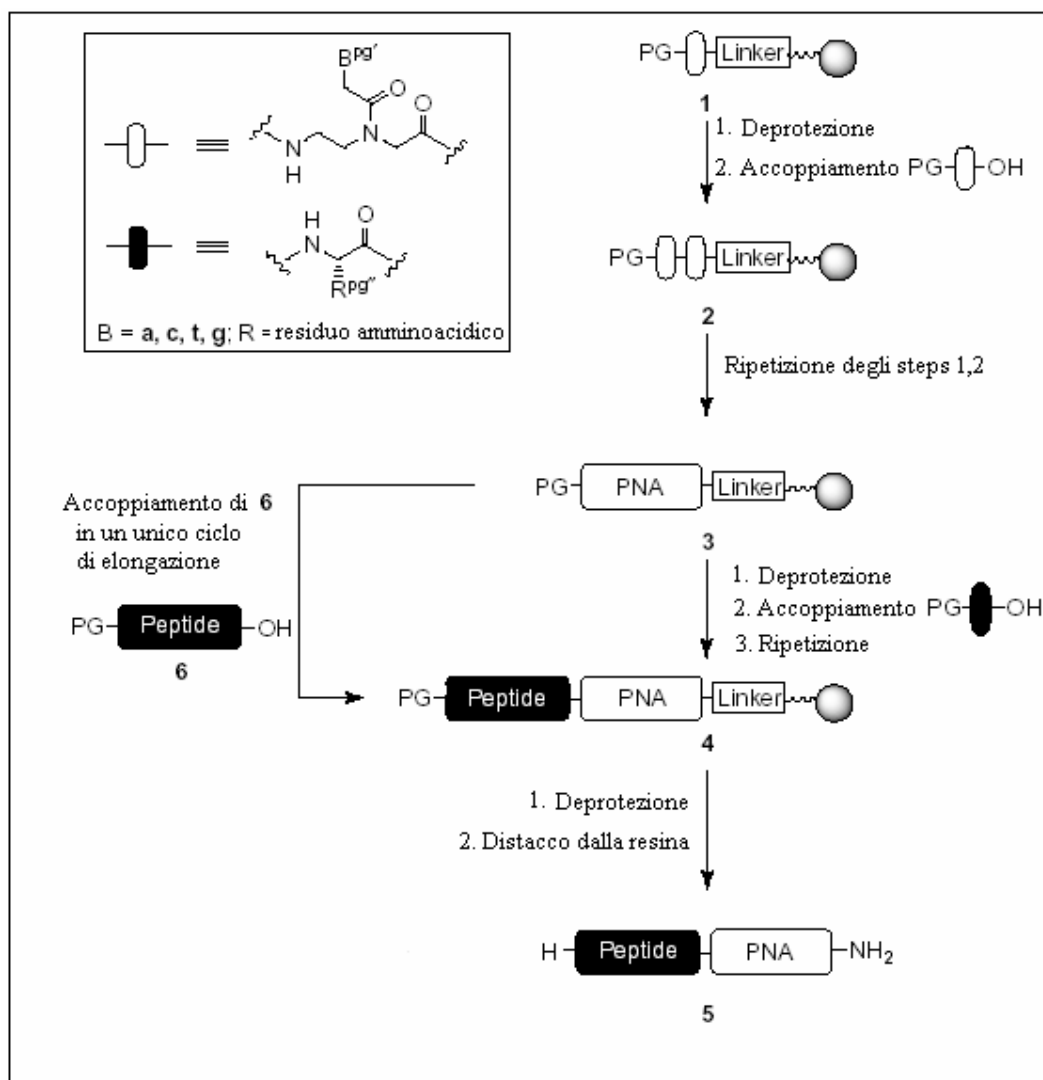


Fig. 11 Strategia di sintesi “on line” in fase solida di coniugati PNA-peptide.

Il limite associato a questa strategia sintetica (definita anche “on line”, dal momento che il peptide ed il PNA sono sintetizzati in maniera sequenziale sullo stesso supporto) è rappresentato dalla lunghezza del coniugato: all’aumentare dei residui le rese di accoppiamento si abbassano, il numero di sequenze troncate aumenta, la purificazione diventa più complessa, la resa finale si abbassa. Per ovviare a ciò si potrebbe utilizzare la cosiddetta sintesi a blocchi, che prevede l’accoppiamento del peptide (6 in figura 11) all’oligomero di PNA ancorato alla resina. Tuttavia, la condensazione di

frammenti peptidici protetti il più delle volte procede lentamente e con scarsa resa a causa di effetti sterici e per la solubilità limitata nei solventi organici. Al contrario, peptidi non protetti hanno in genere buona solubilità in acqua, per cui molta attenzione è stata volta alla messa a punto di metodi alternativi che utilizzano peptidi e PNA non protetti in ambiente acquoso. Un metodo utilizzato di frequente prevede la formazione di un legame disolfurico tra il PNA e il peptide e richiede la derivatizzazione dei due frammenti con funzionalità tioliche, ottenute mediante incorporazione di residui di cisteina all'estremità C o N terminale¹¹ (figura 12a). Per ridurre il rischio della formazione di dimeri simmetrici, può essere conveniente attivare il gruppo tiolico di uno dei due frammenti con il gruppo tiopiridile e sfruttare la nucleofilicità del secondo tiolo (figura 12b). Il legame disolfuro è tuttavia facilmente riducibile nell'ambiente del citosolo. La nucleofilicità del gruppo tiolico può essere sfruttata per preparare derivati più stabili in cui il PNA e il peptide siano legati mediante un legame tioetereo. Ad esempio un tiolo può reagire con il doppio legame di una maleimmide mediante una reazione tipo Michael per dare il coniugato tioetereo¹² (figura 12c).

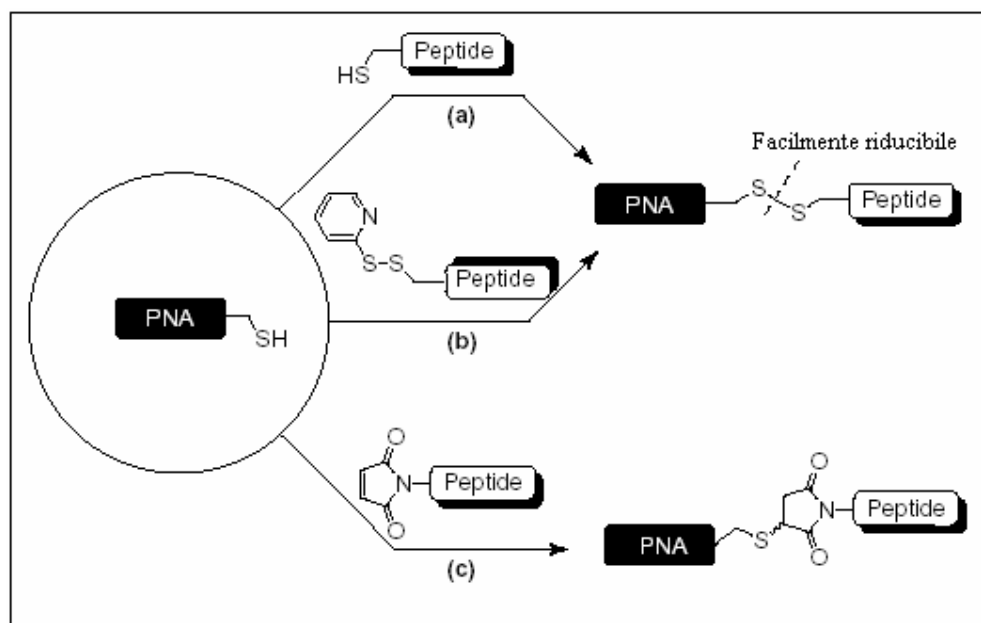


Fig. 12 (a) Reazione ossidativa con formazione di un legame disolfuro tra un PNA ed un peptide. (b) Formazione di un legame disolfuro per attivazione con tiopiridile. (c) Formazione di un legame tioetereo tra un tiolo ed un frammento funzionalizzato con un gruppo maleimmido.

Una strategia alternativa per la coniugazione consiste nella formazione chemoselettiva di un'ossima, mediante reazione di un frammento derivatizzato con un chetone e un altro con un gruppo ossiamminico¹³ (figura 13a). Infine, per ottenere un legame ammidico stabile tra il PNA e il peptide è possibile far reagire un frammento contenente una cisteina in posizione N-terminale con un frammento in cui il C-terminale sia sotto forma di tioestere; la reazione procede attraverso la formazione di un legame tioestereo prima che riarrangi immediatamente per dare un legame ammidico stabile¹⁴ (figura 13b).

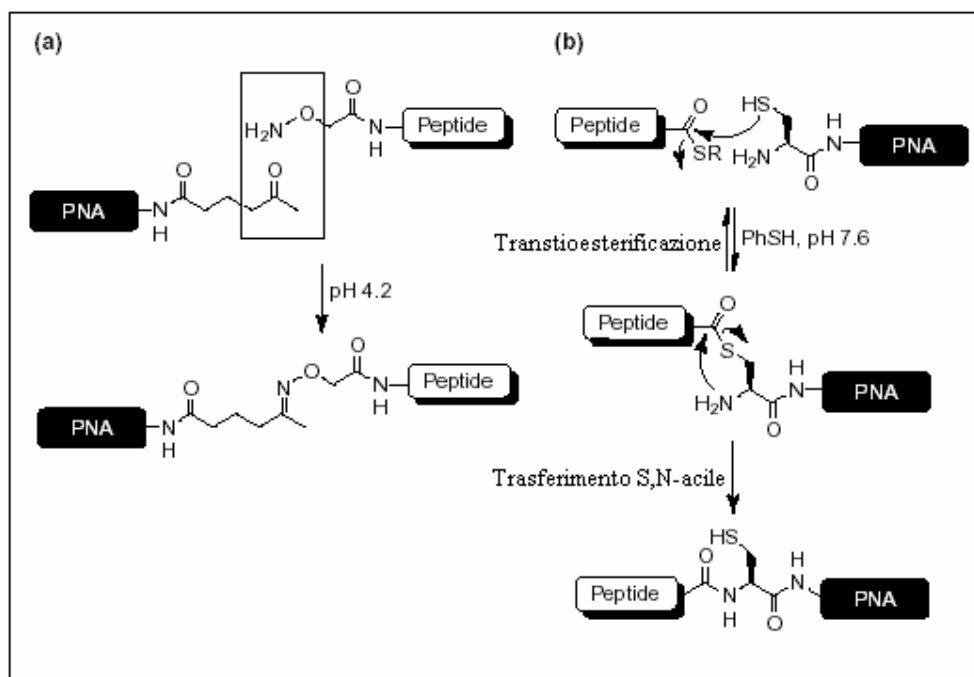


Fig. 13 (a) Coniugazione mediante formazione di ossima. (b) “Chemical ligation” tra un peptide tioestere e un PNA derivatizzato all’N-terminale con cisteina.

In questo lavoro si è scelto di coniugare il peptide al PNA mediante strategia di sintesi “on line” in fase solida, dal momento che, essendo la sequenza peptidica composta di soli 8 residui amminoacidici, il coniugato non dovrebbe avere particolare tendenza ad auto-aggregare. E’ stata eseguita la sintesi del peptide NLS (VKRKKKP) in fase solida ed è stato aggiunto un residuo di lisina in posizione N-terminale per evitare che il primo residuo di PNA dovesse legarsi all’azoto secondario della prolina. E’ noto infatti che la formazione di legami peptidici su atomi di azoto secondari risulta più difficile che su atomi di azoto primari, soprattutto quando l’accoppiamento deve essere eseguito con un residuo ingombrato, come nel caso dei PNA. Prima di procedere con la sintesi del PNA, è stata accertata l’identità del peptide mediante HPLC analitico (figura 14) e spettrometria di massa Maldi-Tof (figura 15).

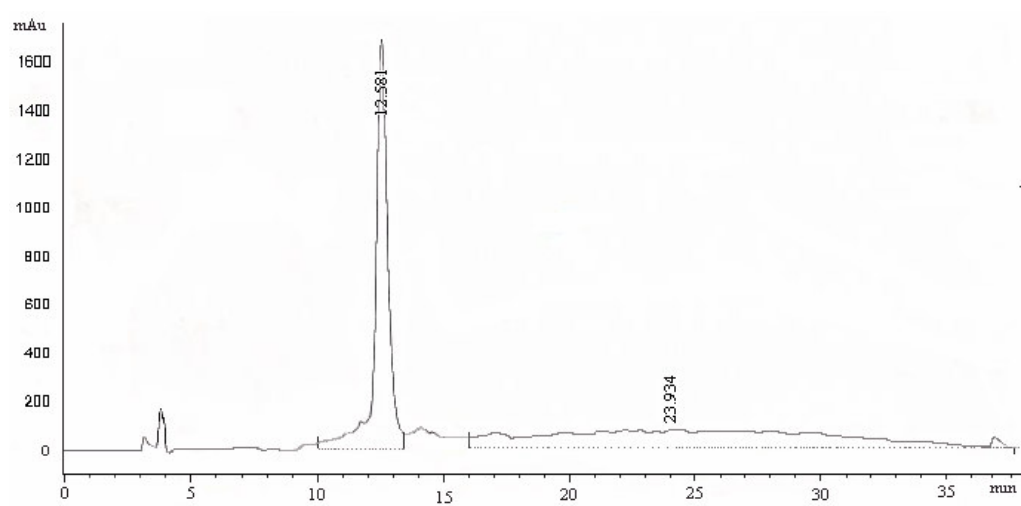


Fig. 14 HPLC del peptide NLS.

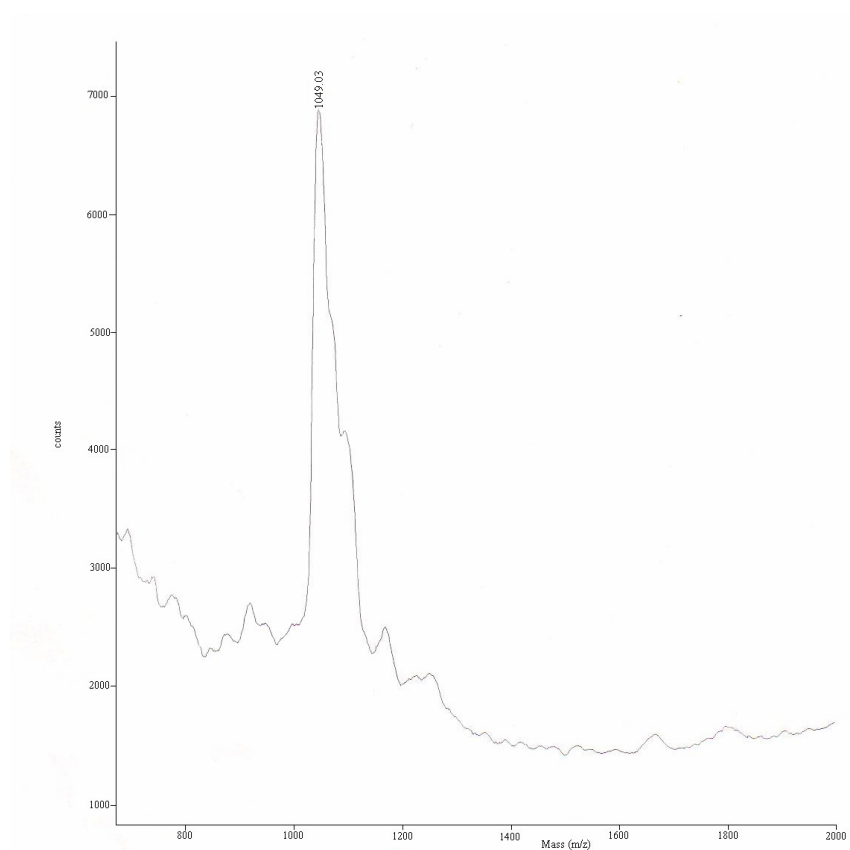


Fig. 15 Spettro Maldi del peptide NLS.

Sul peptide, previa rimozione del gruppo Fmoc, è stato successivamente accresciuto il PNA, mediante sintesi in fase solida su sintetizzatore automatico. Alla fine della sintesi, la resina è stata trattata con una soluzione di TFA/meta-cresolo/TIS (78/20/2) v/v/v per la rimozione dei gruppi protettori ed il contemporaneo distacco dell'oligomero dal supporto solido. Il coniugato PNA-peptide è stato analizzato mediante HPLC analitico in fase inversa e purificato mediante HPLC semipreparativo. L'analisi di massa del grezzo ha rivelato la presenza del coniugato PNA-peptide desiderato.

Di seguito sono riportati il profilo HPLC del grezzo relativo al coniugato PNA-peptide (PNA110/NLS) (figura 16) per dimostrare la bontà della sintesi ed inoltre il profilo HPLC (figura 17) e lo spettro di massa MALDI-TOF del coniugato puro (figura 18).

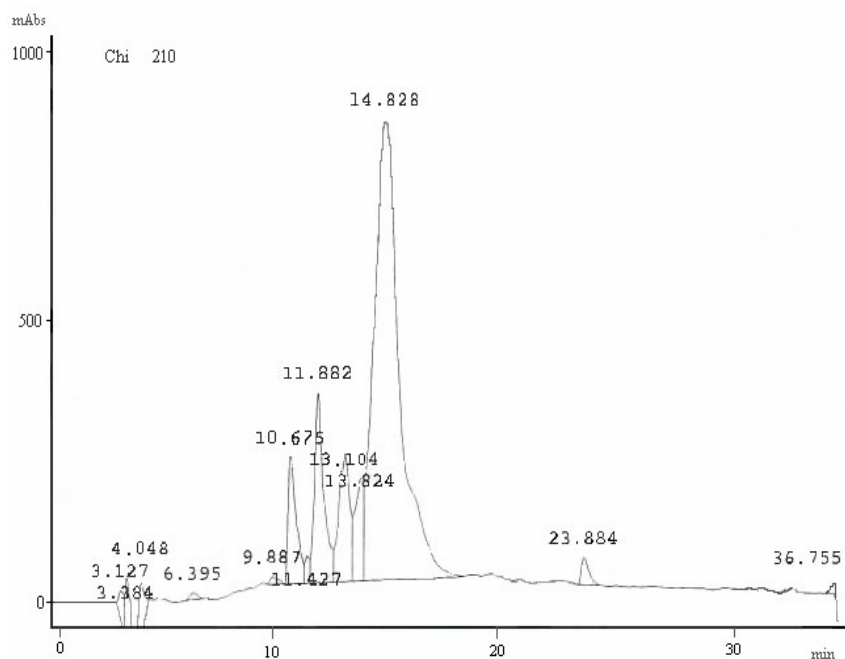


Fig. 16 HPLC del coniugato PNA-peptide (PNA110/NLS) grezzo.

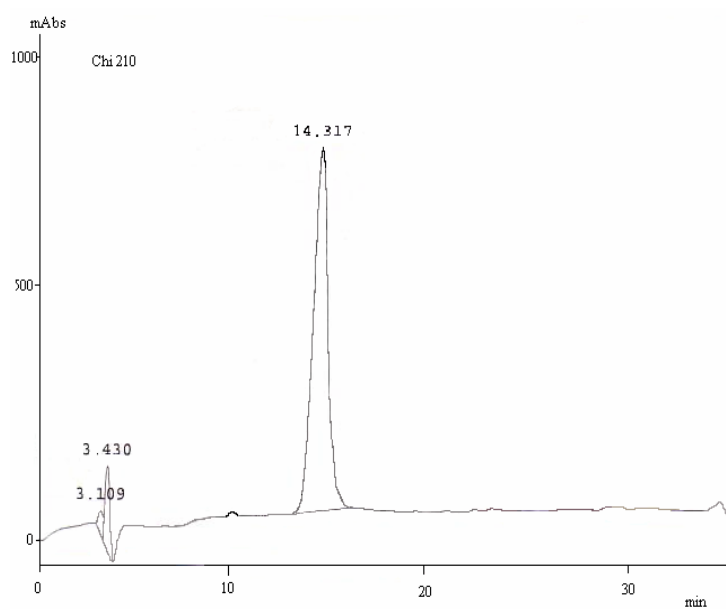


Fig. 17 HPLC del coniugato PNA-peptide (PNA110/NLS) purificato.

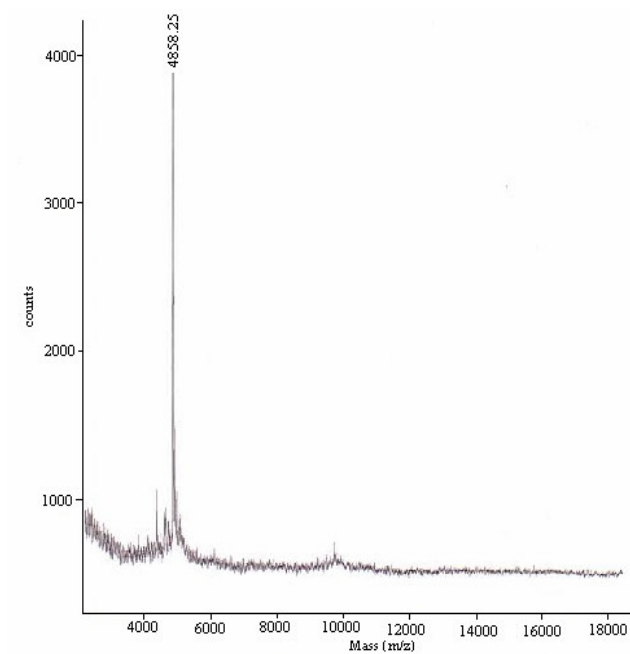


Fig. 18 Spettro Maldi del coniugato PNA-peptide (PNA110/NLS).

Gli oligomeri sintetizzati sono stati successivamente sottoposti ad esperimenti di *binding* con il pre-mRNA complementare del gene della beta globina, per verificare che l'ibridazione sia del PNA che del coniugato PNA-peptide fosse efficiente.

L'affinità delle molecole di PNA sintetizzate nei confronti del target è stata misurata mediante saggio BIA (saggio di interazione biomolecolare). Si tratta di una tecnica che esegue il monitoraggio di interazioni biomolecolari in tempo reale senza il marcamento di alcun componente, combinando l'utilizzo di biosensori con la superficie plasmonica di risonanza (SPR). Tale risonanza è un fenomeno ottico riscontrabile in una sottile lamina metallica in condizioni di totale riflessione che produce un'improvvisa flessione dell'intensità della luce riflessa ad uno specifico angolo (l'angolo di risonanza, θ , figura 19). La posizione dell'angolo dipende da diversi fattori, incluso l'indice di rifrazione del mezzo vicino al lato non illuminato della lamina metallica. Tale indice è direttamente collegato alla concentrazione del materiale disciolto nel mezzo. Pertanto, mantenendo tutti gli altri fattori da cui dipende il valore di θ costanti, tale tecnica può essere usata per misurare cambiamenti nella concentrazione delle molecole nello strato superficiale della soluzione in contatto con la superficie del sensore. Nel "Real Time BIA", uno dei componenti (chiamato ligando) è legato covalentemente ad una matrice di destrano che ricopre una lamina d'oro. Una soluzione di altri componenti (denominata analita) è poi iniettata sulla superficie a flusso continuo. Non appena le molecole dalla soluzione si legano al ligando, cambia il valore dell'angolo di risonanza e tale variazione viene registrata in unità di risposta (RU Response Unit) (figura 20).

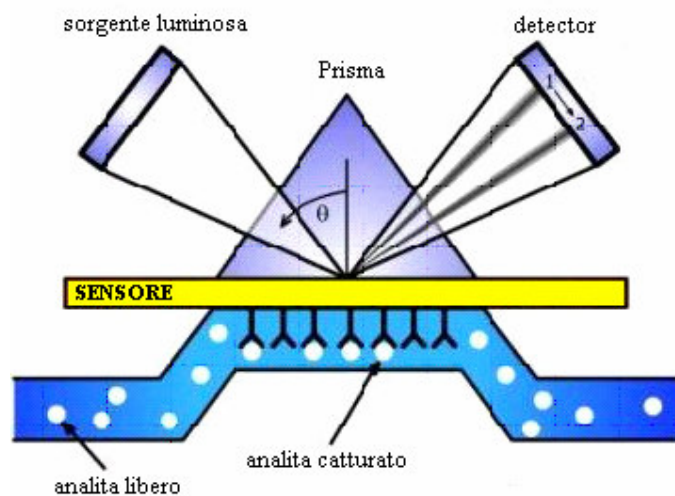


Fig. 19 Rappresentazione del fenomeno SPR sulla superficie del sensore.

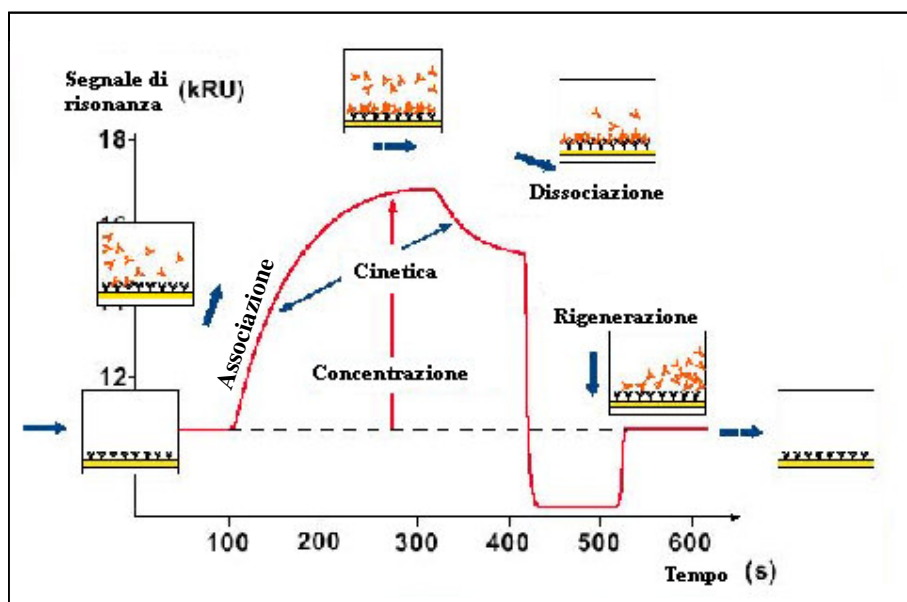


Fig. 20 Andamento di un tipico sensogramma (nei riquadri sono rappresentati i fenomeni di associazione e dissociazione che si verificano sulla superficie del sensore).

In un tipico esperimento di legame mediante SPR, il ligando viene immobilizzato sulla superficie del sensore, successivamente l'analita viene

fatto eluire sulla superficie del sensore ed una completa registrazione dello sviluppo dell'interazione biospecifica può essere ottenuta misurando in continuo l'angolo SPR rispetto al tempo (ottenendo un grafico definito sensogramma). Dopo la fase di associazione, il flusso del solo tampone determina la dissociazione del complesso analita-ligando in un intervallo di tempo che dipende fortemente dalla forza di *binding* tra i due componenti. I valori di RU di un sensogramma associati a quelli di concentrazione dell'analita possono essere utilizzati per ricavare le costanti cinetiche e quelle termodinamiche per gli equilibri di associazione e dissociazione del complesso.

I risultati ottenuti mediante saggio BIA (figura 21) dimostrano che sia il PNA110 che il coniugato PNA 110/NLS ibridizzano in maniera efficiente con la sequenza target di DNA, mentre il solo peptide NLS non si lega al DNA, come atteso.

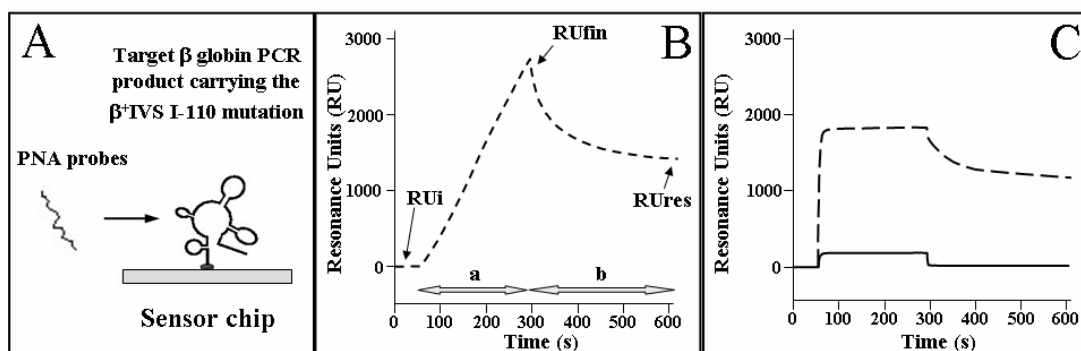


Fig. 21 A. Esperimento BIA. Un prodotto biotinilato di PCR recante la mutazione β^+IVS I-110 è immobilizzato su chip funzionalizzato con Streptavidina e su questo sono inviate sonde di PNA. B,C. Sensogrammi ottenuti dopo iniezione di PNA110 (B), PNA110/NLS (C, linea tratteggiata) o NLS peptide (C, linea continua). **a** = iniezione di 0.3 nmol di ogni sonda sciolta in tampone HBS-EP; **b** = iniezione di 15 μ l di tampone HBS-EP. **RU_i** = unità iniziale di risonanza; **RU_{fin}** = unità finale di risonanza; **RU_{res}** = unità residua di risonanza.

Appurata la capacità delle molecole sintetizzate di ibridizzare la sequenza target, il passo successivo è stato monitorare l'effetto dei PNA sulle reazioni di splicing. A tal fine, sono stati effettuati esperimenti in vitro con estratti nucleari di cellule HeLa. Lo splicing del pre-mRNA è stato condotto per 4 ore a 30°C in presenza o in assenza del PNA110, del PNA110/NLS e del peptide NLS. I prodotti di splicing sono stati, quindi, retrotrascritti e i cDNA ottenuti sono stati amplificati mediante PCR. Tali esperimenti hanno mostrato che lo splicing del trascritto mutato risulta essere sempre meno efficiente rispetto a quello del trascritto wild type. I dati ottenuti (figura 22) purtroppo hanno mostrato che lo splicing di entrambi i trascritti, mutato e wild type, è inibito, ma non riparato, dal PNA110 e dal suo coniugato PNA110/NLS.

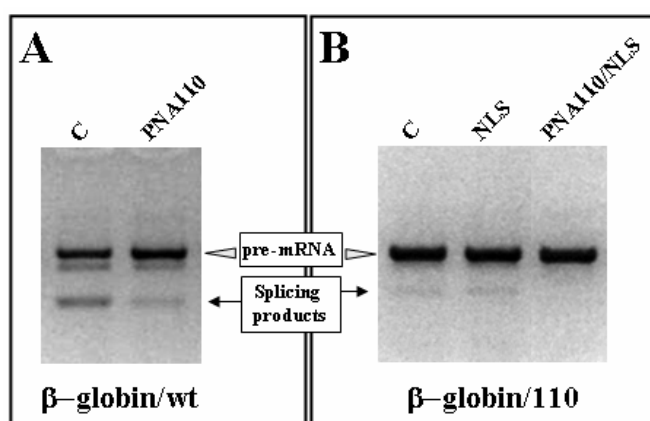


Fig. 22 Effetto in vitro di PNA110 e PNA110/NLS 5 μ M sullo splicing del pre-mRNA del wild type (A) e del mutante IVS I-110 (B). I prodotti delle reazioni di splicing sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 3%. C, controllo di reazione senza PNA; NLS, pre-mRNA incubato con il peptide NLS 5 μ M.

Molto probabilmente, la ragione di tale comportamento va ricercata nel fatto che i due siti di splice, corretto e aberrante, sono abbastanza vicini l'un l'altro (distanza di appena 20 nucleotidi). E' quindi ipotizzabile che la sequenza di PNA scelta vada ad interferire contemporaneamente con entrambi i *pathway* di splicing, aberrante e corretto. Inoltre, tutti gli elementi importanti per il processo di splicing (i due siti di splice, il sito di branch, il tratto polipirimidinico) sono localizzati in un intervallo di soli 37 nucleotidi.

Pertanto, è ragionevole pensare che una sequenza antisense diretta nel centro di questa regione possa interferire con il legame di un ampio numero di fattori, inibendo ogni forma di splicing per motivi di ingombro sterico. Ciò spiegherebbe la totale inibizione dello splicing osservata sperimentalmente.

Un aspetto singolare riscontrato nello studio dello splicing a carico della regione IVS1-110 del gene della β -globina è rappresentato dal fatto che se si introducono all'interno del corretto sito di *branch* mutazioni tali da inattivarlo, si attiva contemporaneamente un altro sito di *branch*, criptico, a livello del nucleotide 107 (figura 23) che deve necessariamente usare come sito 3' di splice quello corretto e non quello criptico, distando da quest'ultimo di appena 5 nucleotidi. Il risultato, sorprendente, è che non si ha più splicing aberrante, con conseguente produzione del corretto mRNA.¹⁵

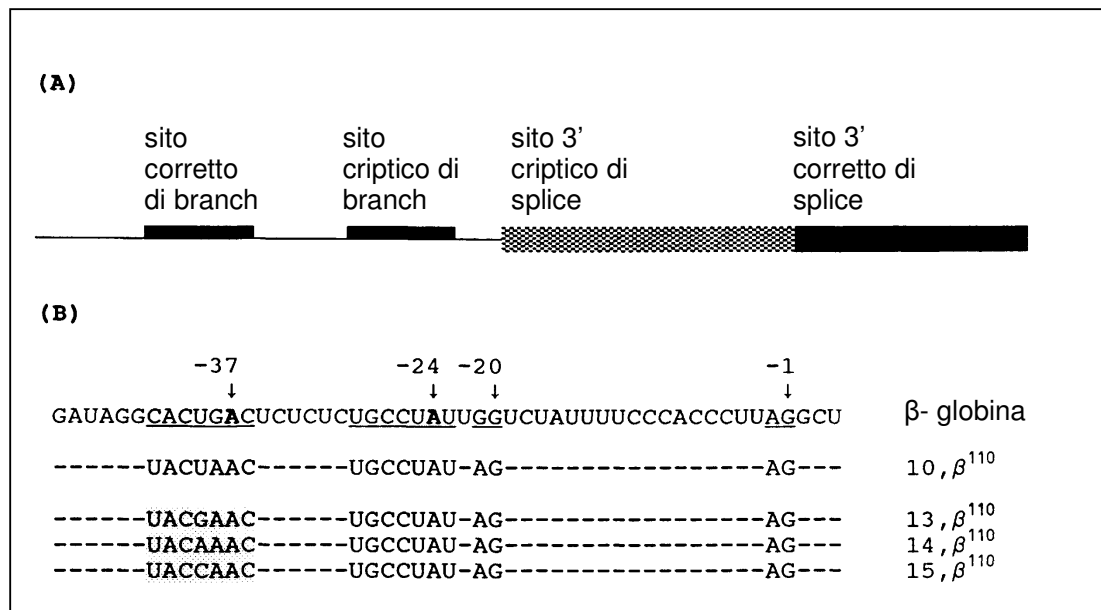


Fig. 23 (A) Rappresentazione schematica delle posizioni relative dei due siti di "branch" e dei due siti 3' di splice sulla sequenza di RNA mostrata in B. (B) Corrispondenti sequenze del pre-mRNA del gene wild-type della β globina (riga in alto) e di vari mutanti (in basso). I numeri sulla sequenza wild-type indicano le distanze, in termini di nucleotidi, di ogni sito di branch e del sito 3' criptico di splice dal corretto sito 3' di splice.

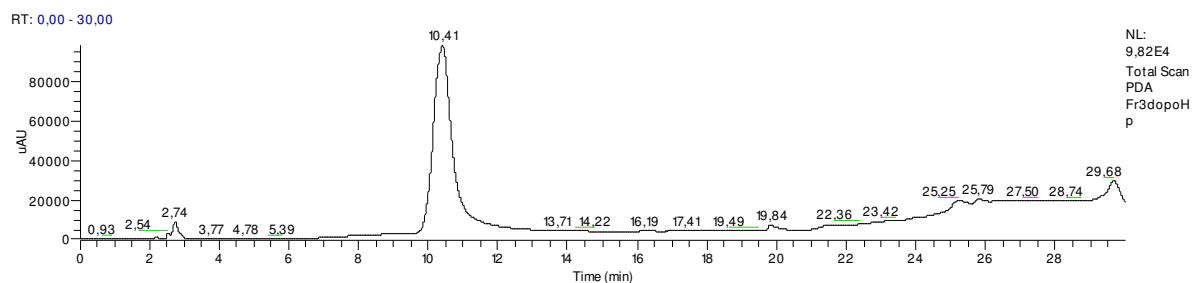
E' ragionevole, pertanto, supporre che un oligonucleotide antisense complementare al corretto sito di *branch* possa inibirne, come le mutazioni, il coinvolgimento nel pathway di splicing e dirigere il processo sul sito di *branch* criptico. Sulla base di queste considerazioni, si è deciso di sintetizzare una nuova sequenza di PNA tale da essere complementare al sito corretto di *branch*. Ricordando che quest'ultimo è localizzato a livello del nucleotide 94, la nuova sequenza di PNA (PNA110bis), di seguito illustrata, è stata disegnata in maniera tale da essere complementare alla regione 82-95.

PNA110bis H-GTCAGTGCCTATCA-NH₂

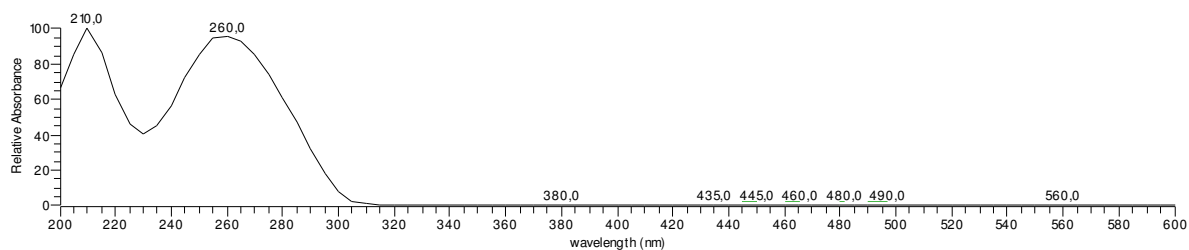
La nuova sequenza è stata sintetizzata seguendo lo stesso protocollo precedentemente illustrato per l'ottenimento del PNA110 ed è stata anch'essa successivamente coniugata al peptide NLS (PNA110bis/NLS).

PNA110bis/NLS H-GTCAGTGCCTATCA- KPKKKRKV-NH₂

La purificazione e la caratterizzazione sono state effettuate, rispettivamente, mediante HPLC semipreparativo e spettrometria di massa ESI. A conferma della purezza e dell'identità delle molecole sintetizzate, sono di seguito mostrati i relativi cromatogrammi e spettri di massa (figure 24, 25); lo spettro UV del PNA e del coniugato, come atteso, è caratterizzato da un massimo a 260 nm, dovuto alle basi eterocicliche e da un massimo a 210 nm, ascrivibile ai legami peptidici presenti.



Fr3dopoHp #3020-3219 RT: 10,06-10,73 AV: 200 SB: 452 7,17-7,80, 8,13-9,00 NL: 4,25E5 microAU



Fr3dopoHp #2305-2476 RT: 10,20-10,95 AV: 43 SB: 114 9,53-10,36, 10,80-11,96 NL: 2,59E3

F: (0,0) +c ESI corona sid=40,00 det=1082,00 Full ms [500,00-2000,00]

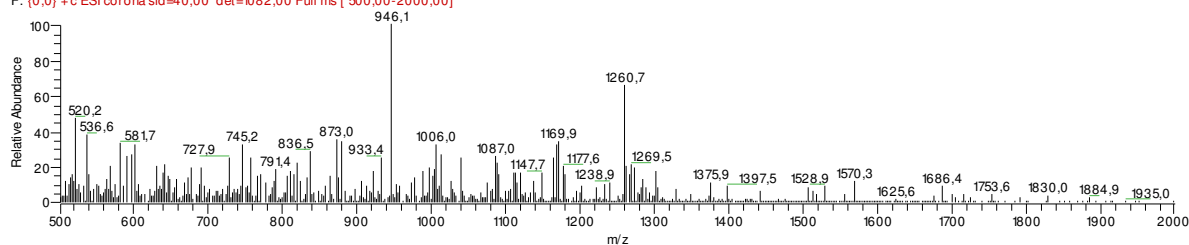
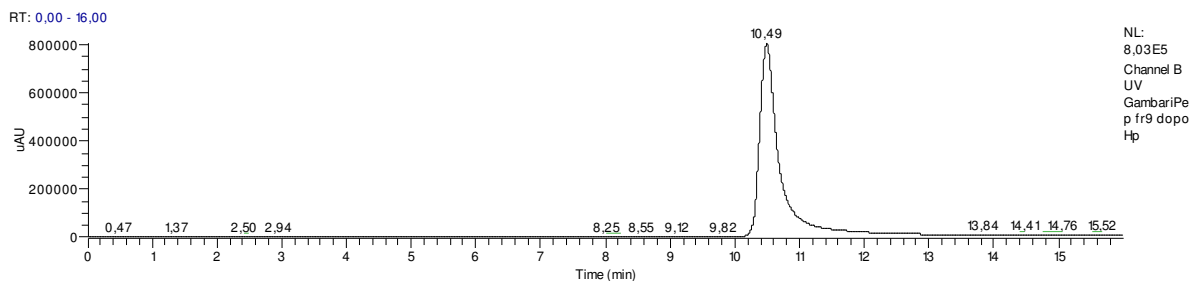
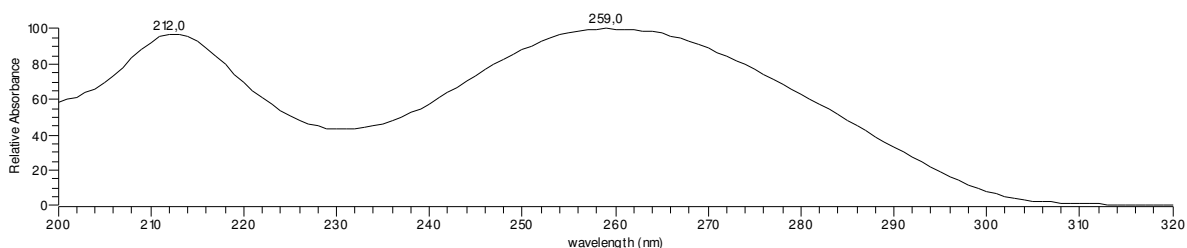


Fig. 24 Spettro LCMS del PNA110bis.



GambariPep fr9 dopo Hp #3091-3229 RT: 10,30-10,76 AV: 139 NL: 4,79E5 microAU



GambariPep fr9 dopo Hp #2473-2592 RT: 10,38-10,88 AV: 80 SB: 728 8,00-10,43, 10,90-13,04 NL: 5,35E3
T: [0:2] +c ESI corona sid=70,00 det=1082,00 Full ms [500,00-2000,00]

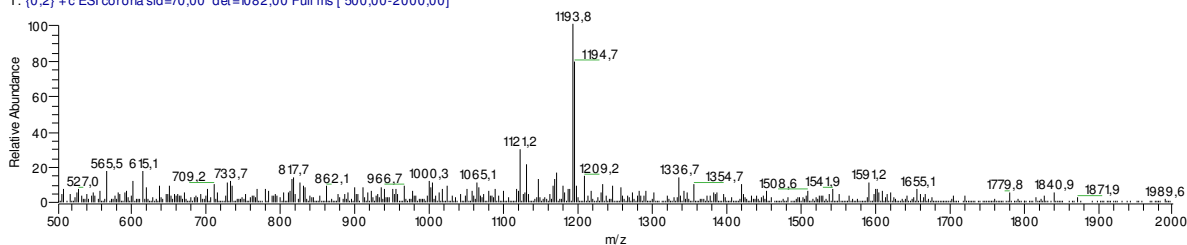


Fig. 25 Spettro LCMS del coniugato PNA110bis/NLS.

La capacità dei nuovi oligomeri di PNA di correggere lo splicing del gene della β -globina sarà valutata in vitro effettuando gli stessi saggi condotti con le molecole precedentemente sintetizzate.

2.1.b Gene TrKAIII

Il secondo sistema su cui è stata saggiata la capacità antisense dei PNA è rappresentato dal gene TrKAIII, una nuova variante di splicing del recettore TrkA, recentemente identificato come uno dei principali attori nello sviluppo del neuroblastoma.

Assieme al medulloblastoma, il neuroblastoma è uno dei tumori solidi più diffusi del sistema nervoso.

I tumori del sistema nervoso derivano da anomalie nei processi di sviluppo in conseguenza di difetti genetici e/o epigenetici, che conducono all'alterazione di importanti processi biologici. L'infanzia rappresenta la fascia d'età maggiormente colpita da questi tumori. Al momento, neuroblastoma e medulloblastoma presentano prognosi difficili e sono resistenti sia ai protocolli chemioterapeutici standard che a quelli più avanzati. Generalmente, la mancata risposta ad un trattamento chemioterapico è dovuta a diversi meccanismi che portano ad un'alterata espressione genica all'interno della cellula tumorale. Sono stati identificati diversi geni responsabili della resistenza agli agenti chemioterapici.

Il Neuroblastoma è il tumore solido più comune dell'infanzia, con più di 100 nuovi casi per anno in Italia e più di 700 negli Stati Uniti. Questo tumore sembra avere origine da uno sviluppo anomalo delle cellule della cresta neurale da cui prendono origine la midollare del surrene e i gangli del sistema nervoso simpatico. Ha una presentazione clinica ed un comportamento biologico estremamente variabile; esso può anche andare incontro a regressione spontanea o differenziarsi in un ganglioneuroma benigno nei pazienti di età inferiore ad un anno. Al contrario, nei bambini che hanno più di un anno di età il neuroblastoma si presenta come una malattia molto aggressiva e già metastatizzata al momento della diagnosi, con prognosi negativa.

Il recettore per il fattore di crescita nervoso NGF denominato TrkA è essenziale per lo sviluppo e la maturazione del sistema nervoso centrale e periferico, regolandone la proliferazione, il differenziamento e l'apoptosi.¹⁶ Sebbene il neuroblastoma sia stato spesso associato con un numero di polimorfismi non-codificanti e mutazioni puntiformi nel gene TrkA,¹⁷ questo tumore non è stato per il momento correlato con un'attivazione oncogenica di TrkA. Infatti, linee cellulari di neuroblastoma mostrano in vitro una perdita generale della risposta a NGF.¹⁸ Inoltre, l'espressione della forma nativa di TrkA mostra una correlazione inversa con l'aggressività del neuroblastoma.¹⁹ Questa proprietà potrebbe, quindi, essere utilizzata come un potenziale marker per una buona prognosi. La risposta all'NGF può essere, tuttavia, recuperata in linee cellulari di neuroblastoma attraverso la traduzione genica di TrkA. Questo suggerisce che la mancata risposta possa essere dovuta a livelli sub-ottimali di TrkA.²⁰ La recente identificazione di una nuova variante di splicing alternativo, TrKAIII, regolata dall'ipossia, espressa da tumori neuroblastici derivati dalla cresta neurale, ha aperto una nuova prospettiva nel potenziale coinvolgimento di TrkA nei tumori.²¹ L'osservazione che l'ipossia, che caratterizza il microambiente tumorale, stimoli la formazione della forma di splicing alternativo TrKAIII, fornisce una via attraverso la quale i segnali antioncogenici di TrkA possono essere convertiti in segnali di promozione tumorale durante il processo di progressione. Questa osservazione è, inoltre, consistente con la conservazione e la conversione patologica, nei tumori neuroblastici derivanti dalla cresta neurale, di un meccanismo di potenziale importanza fisiologica presente nei progenitori delle normali cellule staminali della cresta neurale.

A differenza delle isoforme TrkAI e II (le quali hanno un importante ruolo oncosoppressore nella proliferazione e nel differenziamento delle cellule del sistema nervoso centrale e periferico), TrKAIII mostra una auto-fosforilazione

spontanea, che è responsabile dell'attività fisiologica del recettore. Lo splicing alternativo di TrkA che genera TrkAIII provoca la delezione degli esoni 6-7 e 9. Queste regioni corrispondono ai domini extracellulari IG-CI ed ai domini di N-glicosilazione del recettore TrkA (fig. 26).

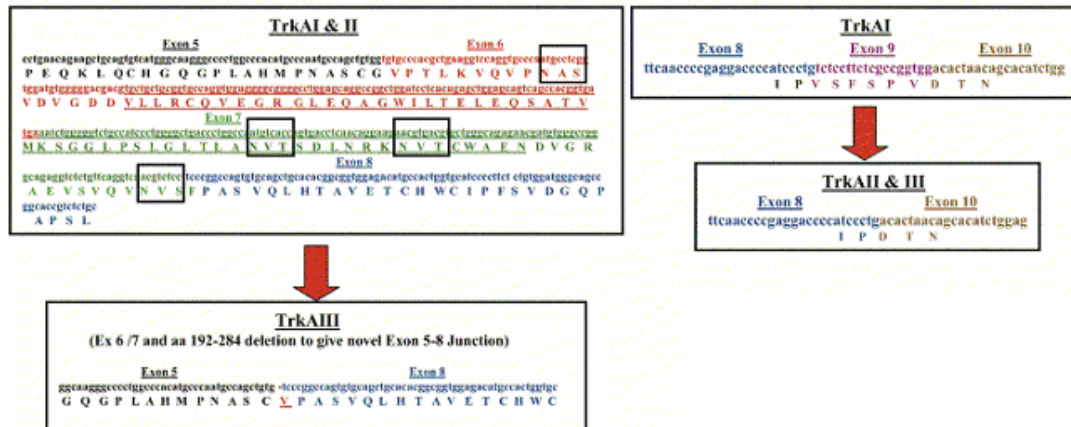


Fig. 26 Splicing alternativo del gene TrkA. L'isoforma TrkAIII si genera in seguito alla delezione degli esoni 6-7 e 9.

E' interessante osservare che la sequenza dell'mRNA che corrisponde ad una delle due nuove giunzioni di splicing (5-8) è specifica per TrkAIII ed essa, quindi, rappresenta un target ideale per lo sviluppo di potenziali agenti terapeutici. In questo contesto, è molto probabile che l'attività di TrkAIII come promotore tumorale possa essere significativamente ostacolata attraverso l'utilizzo di molecole antisense. In altre parole, l'attività di questo fattore oncogeno può essere inibita bersagliando la regione di mRNA corrispondente alla giunzione tra gli esoni 5-8.

Ulteriore obiettivo del presente lavoro è stato quello di sintetizzare un PNA complementare alla sequenza corrispondente alla giunzione degli esoni 5-8 dell'mRNA di TrkA, allo scopo di ottenere una molecola antisense in grado di inibire selettivamente lo splicing alternativo di TrkA e quindi la

sintesi della proteina TrkAIII. La molecola è costituita da un oligomero di 12 basi di PNA ed è di seguito riportata:

TrKAIII-PNA H-GGCCGGGACACA-NH₂

Al fine di aumentare l'internalizzazione in cellula, sono stati altresì progettati opportuni coniugati tra peptidi in grado di attraversare la barriera cellulare e l'oligonucleotide che bersaglia l'mRNA di TrkAIII. Sono stati scelti, a tal fine, il peptide segnale di localizzazione nucleare NLS ed il peptide (AAKK)₄²² contenente tutti amminoacidi a chiralità D, inseriti al fine di minimizzarne la degradazione in cellula da parte di proteasi. Entrambi i peptidi sono stati coniugati al PNA mediante strategia di sintesi "on line" in fase solida. La coniugazione è stata eseguita all'estremità C-terminale, sintetizzando dapprima il peptide e facendovi successivamente crescere la catena di PNA. Di seguito sono riportati i due costrutti PNA-peptide:

TrKAIII-PNA /NLS H- GGCCGGGACACA – KPKKKRKV - NH₂

TrKAIII-PNA /D(AAKK)₄ H- GGCCGGGACACA -(AAKK)₄- NH₂

Sia il PNA che i coniugati sono stati sintetizzati su fase solida mediante chimica Fmoc su resina PALPEG-PS e purificati mediante HPLC semipreparativo. Il distacco e la deprotezione sono stati effettuati con una soluzione di TFA/m-cresolo per quanto riguarda il solo PNA e con TFA/m-cresolo/TIS per i coniugati. L'identità dei composti è stata quindi accertata tramite spettrometria di massa ESI. Di seguito sono riportati i cromatogrammi e spettri di massa sia del PNA (figura 27) che dei coniugati (figure 28 e 29).

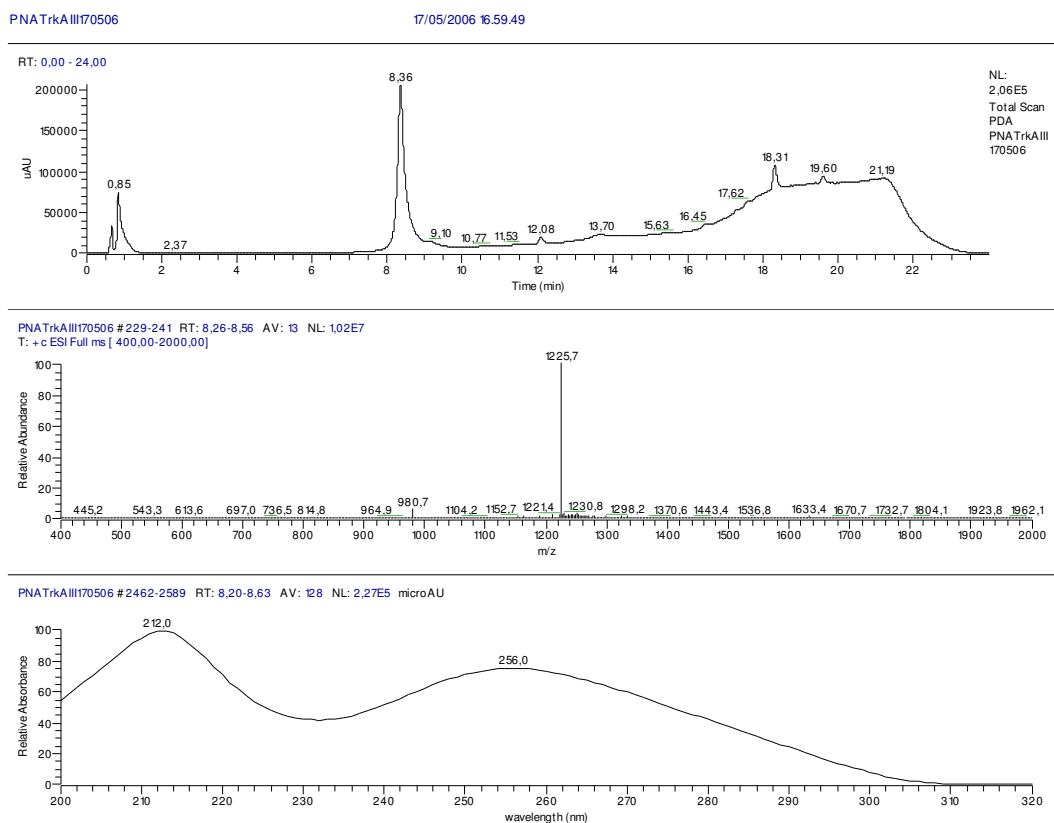


Fig. 29 Spettro LCMS di TrKAIII-PNA/D(AAKK)₄.

Una volta sintetizzate le molecole di PNA desiderate, il passo successivo è stato monitorarne l'effetto sulle reazioni di splicing. A tal fine, sono state utilizzate due linee cellulari di neuroblastoma, SH-SY5Y, trasfettate stabilmente con TrKAI e TrKAIII così da sondare la capacità dei PNA di interagire specificamente solo con TrKAIII e non con le altre isoforme di TrKA. L'attività biologica dei PNA è stata misurata valutando l'attività in vitro sull'espressione genica (a livello sia di mRNA che di proteina) e sulla proliferazione cellulare. L'analisi dell'espressione degli mRNA ha previsto l'estrazione di RNA da cellule stabilmente trasfettate con i geni TrKAI e TrKAIII e trattate per 4 giorni con concentrazioni da 0 a 10

μ M di TrKAIII-PNA/NLS. Gli mRNA sono stati retrotrascritti e i cDNA ottenuti sono stati amplificati mediante PCR ed analizzati per elettroforesi su gel di agarosio con etidio bromuro e fotografati. La quantificazione e la normalizzazione del cDNA presente nei campioni è stata fatta per paragone con l'amplificazione di un gene "house-keeping" quale GAPDH usato come controllo degli esperimenti (fig. 30A).

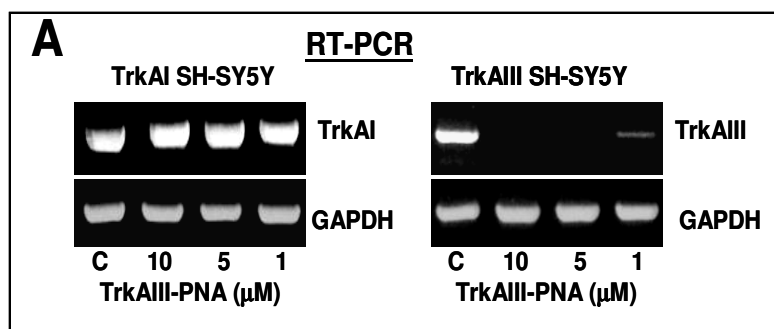


Fig. 30A Gel di agarosio con i prodotti di RT-PCR ottenuti dagli mRNA purificati da linee cellulari SH-SY5Y stabilmente transfettate con i geni TrkAI e TrKAIII (risultati identici sono stati ottenuti con TrKAIII-PNA/D(AAKK)₄).

L'analisi dell'espressione delle proteine è stata effettuata mediante western blot su cellule stabilmente transfettate con i geni TrkAI e TrKAIII e trattate per 14 giorni con TrKAIII-PNA/NLS e TrKAIII-PNA/D(AAKK)₄ 10 μ M. E' stato utilizzato come controllo il segnale rilevato con l' α -tubulina (fig. 30B).

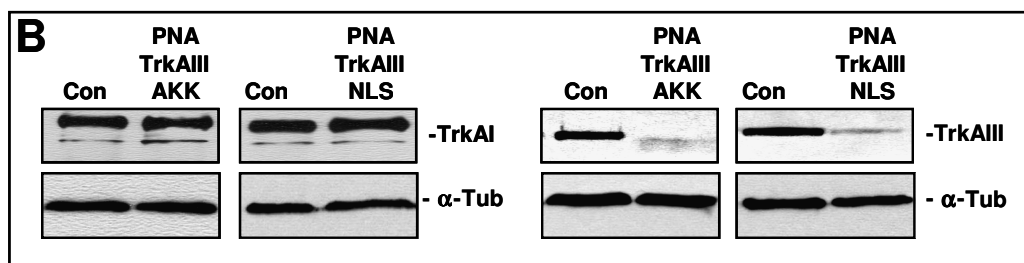


Fig. 30B Analisi dell'espressione delle proteine mediante western blot.

Entrambi gli esperimenti hanno mostrato come TrKAIII-PNA/NLS e TrKAIII-PNA/D(AAKK)₄ siano di fatto in grado di inibire specificamente

TrKAIII. Come ulteriore conferma del risultato ottenuto, sono stati altresì condotti esperimenti di proliferazione cellulare mediante saggio MTS sulle cellule stabilmente transfettate con i geni TrKAI e TrKAIII e pretrattate per 14 giorni con TrKAIII-PNA/NLS 10 μ M. Dopo 2 giorni dal trattamento è stata determinata la vitalità cellulare mediante il saggio colorimetrico. Questo si basa sull'utilizzo di un reagente contenente il composto tetrazolio MTS, che, in cellule attive dal punto di vista metabolico, viene ridotto ad opera degli enzimi deidrogenasi in un composto colorato, il formazano. L'assorbanza del prodotto colorato viene letta a 492 nm ed è direttamente proporzionale al numero di cellule vive presenti in coltura. Il trattamento con il coniugato PNA-peptide non interferisce con la proliferazione delle cellule transfettate col gene TrKAI ma solo con quelle transfettate col gene TrKAIII, ripristinando i corretti livelli di crescita (fig. 30C).

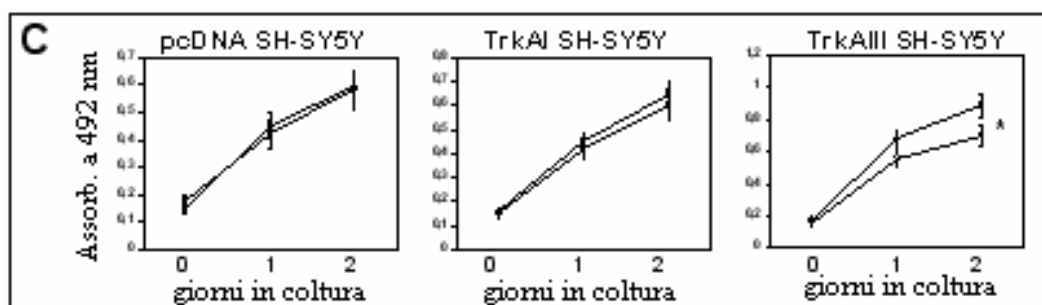


Fig. 30C Studio dell'effetto sulla proliferazione cellulare con saggio MTS.

Alla luce dei risultati ottenuti, si può positivamente concludere che le molecole sintetizzate sono altamente specifiche nell'inibire solo l'isoforma oncogenica TrKAIII ma non TrKAI, come desiderato. Il passo successivo sarà, quindi, verificare, tramite esperimenti in vivo, se tali molecole conservano i promettenti effetti trovati in vitro.

2.2. Conclusioni

Obiettivi principali della prima fase del lavoro di ricerca sono stati la sintesi, la caratterizzazione strutturale e la sperimentazione in vitro di analoghi oligonucleotidici, al fine di ottenere nuove molecole potenzialmente utili per il trattamento terapeutico di gravi patologie (quali tumori e malattie di origine genetica).

La ricerca è stata focalizzata su tematiche molto rilevanti per la salute umana, quali la β -talassemia ed il neuroblastoma. Sono stati, infatti, progettati oligomeri di PNA quali agenti antisense in grado di interagire specificamente con opportune sequenze dell'mRNA dei geni della β -globina e di TrKAIII.

Il primo sistema su cui è stata saggiata l'attività antisense del PNA è stato il gene della β -globina. Nell'introne 1 in corrispondenza del nucleotide 110 è stata rinvenuta una mutazione puntiforme che ha portato alla sostituzione di una guanina con una adenina, con conseguente produzione di un mRNA "difettoso", non più in grado di codificare per globine aventi sequenza amminoacidica corretta.

Sono state sintetizzate due sequenze di PNA, di seguito riportate.

PNA110 H- AATAGACTAATAGG -NH₂

PNA110bis H- GTCAGTGCCTATCA -NH₂

Inoltre, al fine di aumentare l'*uptake* cellulare dei PNA, questi sono stati coniugati ad un peptide segnale di localizzazione nucleare (PNA 110/NLS e PNA 110bis/NLS).

PNA110/NLS H- AATAGACTAATAGG- KPKKKRKV -NH₂

PNA110bis/NLS H- GTCAGTGCCTATCA- KPKKKRKV -NH₂

La prima sequenza di PNA sintetizzata (PNA110) è stata scelta in modo tale da essere complementare al tratto 104-117 dell'introne 1 del gene mutato della β -globina. Il sito 3' di splice aberrante che si attiva a livello del nucleotide 111 ci è apparso, infatti, come il bersaglio più ovvio ai fini della regolazione del *pathway* di splicing. Bloccare questa regione avrebbe, di fatto, dovuto essere la via più immediata per forzare la macchina di splicing ad utilizzare il sito di splice corretto.

L'affinità delle molecole di PNA sintetizzate nei confronti dell'mRNA complementare è stata misurata mediante saggio BIA (saggio di interazione biomolecolare). Appurata la capacità delle molecole sintetizzate di ibridizzare la sequenza bersaglio, il passo successivo è stato monitorare l'effetto dei PNA sulle reazioni di splicing. A tal fine, sono stati effettuati esperimenti in vitro con estratti nucleari di cellule HeLa. I dati ottenuti hanno, purtroppo, dimostrato che lo splicing del trascritto mutato del gene della β -globina è inibito dal PNA110 e dal suo coniugato PNA110/NLS.

Abbiamo pensato che la razionalizzazione di tale comportamento andasse ricercata nel fatto che i due siti di splice, corretto e aberrante, sono abbastanza vicini l'un l'altro. Ci è sembrato, pertanto, ragionevole ipotizzare che la sequenza di PNA scelta potesse interferire contemporaneamente con entrambi i *pathway* di splicing, aberrante e corretto, inibendo ogni forma di splicing per motivi di ingombro sterico.

Di qui la scelta di sintetizzare una seconda sequenza di PNA (PNA110bis), disegnata in maniera tale da essere complementare alla regione 82-95 che contiene il corretto sito di *branch*. Tale scelta è stata sostenuta anche dalla considerazione che, se si introducono all'interno del corretto sito di *branch* mutazioni tali da inattivarlo, si attiva contemporaneamente un altro sito di

branch, criptico, che usa obbligatoriamente come sito 3' di splice quello corretto e non quello criptico, distando da quest'ultimo di appena 5 nucleotidi. Il risultato, sorprendente, è che non si ha più splicing aberrante, con conseguente produzione del corretto mRNA. E' ragionevole, pertanto, ipotizzare che un oligonucleotide antisenso diretto contro il sito di *branch* corretto possa inibirne, come le mutazioni, il coinvolgimento nel *pathway* di splicing e dirigere il processo sul sito di *branch* criptico.

In futuro, la capacità del PNA110bis di correggere lo splicing del gene della β -globina sarà valutata in vitro effettuando gli stessi saggi condotti con il PNA110 inizialmente sintetizzato.

Il secondo sistema saggiato è stato quello del gene TrKAIII, derivante da uno splicing aberrante del gene TrKA con delezione degli esoni 6-7 e 9, recentemente identificato come uno dei principali attori nello sviluppo del neuroblastoma. La sequenza dell'mRNA che corrisponde ad una delle due nuove giunzioni di splicing (5-8) è specifica per TrKAIII ed essa, quindi, rappresenta un target ideale per lo sviluppo di potenziali agenti terapeutici.

La sequenza di PNA sintetizzata (TrKAIII-PNA) è dunque complementare alla giunzione degli esoni 5-8 dell'mRNA del gene TrKAIII. Inoltre, al fine di aumentare l'uptake cellulare del PNA, quest'ultimo è stato coniugato ad un peptide segnale di localizzazione nucleare (TrKAIII-PNA/NLS) e ad un altro peptide carrier contenente tutti amminoacidi a chiralità D (TrKAIII-PNA /D(AAKK)₄), inseriti al fine di migliorare la resistenza alla degradazione in cellula del peptide da parte di proteasi.

TrKAIII-PNA	H- GGCCGGGACACA -NH ₂
TrKAIII-PNA /NLS	H- GGCCGGGACACA-KPKKKRKV -NH ₂
TrKAIII-PNA /D(AAKK)₄	H- GGCCGGGACACA-(AAKK) ₄ - NH ₂

Una volta sintetizzate le molecole di PNA desiderate, il passo successivo è stato monitorarne l'effetto sulle reazioni di splicing. A tal fine, sono state utilizzate due linee cellulari di NB, SH-SY5Y, trasfettate stabilmente con TrKAI e TrKAIII così da sondare la capacità dei PNA di interagire specificamente solo con TrKAIII e non con le altre isoforme di TrKA. L'effetto di inibizione dell'espressione e dell'attività di TrKAIII è stata valutata attraverso RT-PCR, western blot, immunofluorescenza e saggi MTS. Tali esperimenti hanno mostrato come le molecole sintetizzate siano altamente specifiche nell'inibire TrKAIII ma non TrKAI, come desiderato. Il passo successivo sarà, quindi, verificare, tramite esperimenti in vivo, se tali molecole conservano i promettenti effetti trovati in vitro.

Tutti gli oligomeri di PNA, nonché i coniugati PNA-peptide sono stati ottenuti mediante sintesi in fase solida con chimica Fmoc e purificati mediante HPLC in fase inversa. L'identità dei composti è stata accertata tramite spettrometria di massa MALDI-TOF o ESI.

2.3. Parte sperimentale

Materiali e metodi

I PNA sono stati sintetizzati su sintetizzatore automatico di PNA/DNA EXPEDITETM 8909 (Applied Biosystem), utilizzando monomeri di PNA della ditta PRIM. Per la sintesi di tutti i peptidi e PNA è stata utilizzata la resina *PAL-PEG*, fornita dalla ditta Perseptive Biosystem. Gli amminoacidi per la sintesi peptidica ed i reagenti attivanti quali HOBt, HBTU ed HATU sono stati acquistati dalla Novabiochem. I reagenti DIPEA, anidride acetica e TFA dalla ditta Applied Biosystem. Sono stati utilizzati piperidina Biosolve e TIS Sigma-Aldrich. I solventi anidri per la sintesi dei peptidi e dei PNA (DCM, DMF) e quelli per HPLC (acqua, acetonitrile) sono stati forniti dalla ditta Labscan, quelli di grado analitico (etere etilico) dalla ditta J.T.Baker. Le analisi e la purificazione dei prodotti sono state effettuate mediante cromatografia liquida in fase inversa ad alta pressione (RP-HPLC). Le analisi di tipo analitico sono state eseguite su un HPLC analitico Agilent 1100 (Hewlett Packard) dotato di rivelatore UV e autocampionatore. E' stata utilizzata una colonna Phenomenex Jupiter 5 μ m C₁₈ 300Å (4.6x250 mm) ad un flusso di 1 mL/min. Le purificazioni HPLC semipreparative sono state condotte su uno SHIMADZU LC-8A collegato ad un rivelatore UV SPD-10A, usando colonne Phenomenex Jupiter 15 μ m C₁₈ (22x250 mm) e Phenomenex Jupiter Proteo 10 μ m 90Å (250x10 mm) ad un flusso di 5mL/min. Le analisi LC-MS sono state condotte con un sistema costituito da un HPLC della serie Surveyor, usando una colonna Phenomenex Jupiter 5 μ m C₁₈ 300Å, (150x460 mm), comprendente una pompa quaternaria, un

autocampionatore ed un rivelatore a fotodiodi (PDA) ed uno spettrometro di massa Thermo Finnigan equipaggiato con una sorgente elettrospray (modello MSQ). Gli spettri di massa Maldi-TOF sono stati effettuati su uno spettrometro Voyager-DE della Perseptive Biosystem usando come matrice l'acido 3,5 Dimetossi-4-idrossicinnamico e come standard l'insulina bovina (Sigma-Aldrich).

Sintesi e purificazione dei peptidi

La sintesi dei peptidi NLS, di sequenza KPKKKRKV e (AAKK)₄, è stata eseguita in manuale in fase solida, mediante chimica Fmoc su scala di sintesi 0.1 mmol, utilizzando la resina PAL-PEG con grado di sostituzione pari a 0,19 mmol/g.

La sintesi dei due peptidi è stata effettuata impiegando amminoacidi protetti sulle catene laterali mediante gruppi protettori, riportati nella tabella 1, che sono stati rimossi soltanto a sintesi ultimata:

Tabella 1 Fmoc-amminoacidi e gruppi protettori delle catene laterali.

Amminoacido	Derivato protetto
Ala	N α -Fmoc-D-Alanina
Lys	N α -Fmoc-(N $^{\epsilon}$ - <i>terz</i> -butilossicarbonile)-D-Lisina
Val	N α -Fmoc-L-Valina
Lys	N α -Fmoc-(N $^{\epsilon}$ - <i>terz</i> -butilossicarbonile)-L-Lisina
Pro	N α -Fmoc-L-Prolina
Arg	N α -Fmoc-N G -(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-L-Arginina

Il primo stadio della sintesi prevede lo *swelling* della resina in un opportuno solvente organico quale dimetilformammide (DMF) per circa 30 minuti.

Seguono cicli ripetitivi di :

-Deprotezione

-Accoppiamento

-Acetilazione

La deprotezione della funzione amminica consiste nella rimozione del gruppo protettore Fmoc mediante due trattamenti con una soluzione basica costituita da piperidina 20% (v/v) in DMF per 5 minuti, seguiti da due lavaggi a flusso di 25 secondi con DMF. Gli amminoacidi (con eccesso pari a 10 volte la scala di sintesi) sono stati accoppiati utilizzando soluzioni di HOBt/HBTU 0.5M (9.8 equivalenti) in DMF, in presenza di DIPEA (10 equivalenti). La reazione di accoppiamento è stata eseguita a temperatura ambiente per 15 minuti. Gli amminoacidi valina e arginina sono stati accoppiati due volte. I cicli di accoppiamento sono seguiti da due cicli di lavaggio a flusso della durata di 25 secondi. Ogni ciclo di accoppiamento è seguito da un ciclo di acetilazione, eseguito utilizzando una soluzione di anidride acetica/DIPEA/DMF (15/15/70 v/v/v) della durata di cinque minuti e due cicli di lavaggio a flusso con DMF di 25 secondi.

Al termine della sintesi, la resina è stata lavata con DMF, DCM ed etere etilico e seccata. Il distacco di ogni peptide dalla resina avviene in condizioni acide. Questa reazione viene effettuata mediante trattamento con una soluzione composta da: 95% TFA, 2.5% TIS e 2.5% H₂O (v/v/v), sotto agitazione per 3 ore a temperatura ambiente. Il TIS funge da scavenger di radicali liberi e di carbocationi che vengono liberati durante la rimozione dei gruppi protettori presenti sulle catene laterali. La resina è quindi stata separata dalla soluzione per filtrazione e lavata ripetutamente con TFA. Il filtrato e i

lavaggi sono stati poi riuniti e concentrati. Il peptide grezzo è stato precipitato con etere etilico a freddo.

Il precipitato è stato seccato e quindi liofilizzato.

I peptidi prodotti attraverso le sintesi in fase solida sono stati poi caratterizzati mediante cromatografia HPLC ed analisi LC-MS o spettrometria di massa Maldi-Tof.

Il *peptide NLS* è stato analizzato mediante HPLC analitico in fase inversa, utilizzando un gradiente crescente di acetonitrile (0.1% TFA) in acqua (0.1% TFA), da 0 al 73% in 30 minuti. La caratterizzazione è stata effettuata mediante spettrometria di massa MALDI-TOF.

Massa calcolata: $[M+H]^+ = 1026,33 \text{ m/z}$

Massa osservata: $[M+Na]^+ = 1049,03 \text{ m/z}$

Il *peptide (AAKK)₄* è stato analizzato mediante LC-MS utilizzando un gradiente crescente di acetonitrile (0.05% TFA) in acqua (0.05% TFA) dal 5 al 70% in 30 minuti. L'analisi di massa ha confermato la presenza del peptide desiderato protetto sull'estremità N-terminale con il gruppo Fmoc.

Massa calcolata: $[M + 3H]^{3+} = 612.0 \text{ m/z}$

Massa osservata: $[M + 3H]^{3+} = 612.1 \text{ m/z}$

Sintesi e purificazione dei PNA

La sintesi degli oligomeri di PNA è stata effettuata in fase solida su resina PAL-PEG (grado di funzionalizzazione 0.19 mmol/g), con scala di sintesi 2 µmol su sintetizzatore automatico, utilizzando protocolli standard ciclici per la sintesi di PNA.

Sono stati utilizzati i seguenti monomeri di PNA, commercialmente disponibili:

Fmoc-T-OH

Fmoc-A (Bhoc)-OH

Fmoc-C(Bhoc)-OH

Fmoc-G(Bhoc)-OH

I protocolli prevedono cicli ripetitivi di deprotezione, accoppiamento e acetilazione.

La deprotezione è stata eseguita con 1.12 mL di piperidina al 20% in DMF per circa 2 minuti.

L'accoppiamento dei monomeri di PNA è stato eseguito utilizzando soluzioni 0.2M di monomeri (8 equivalenti) in DMF anidra, in presenza di 7.2 equivalenti di attivante HATU 0.18M in DMF, 8 equivalenti di DIPEA 0.3 M in DMF e 12 equivalenti di 2,6 lutidina 0.3M in DMF per 8 minuti.

L'acetilazione viene effettuata utilizzando 0.8 mL di una soluzione contenente anidride acetica 5%, 2,6 lutidina 6% in DMF per 3 minuti.

Alla fine della sintesi la resina è stata lavata con DMF, DCM ed etere etilico e poi seccata sotto vuoto. Il PNA è stato distaccato dal supporto solido mediante trattamento con una miscela TFA/m-cresolo 4/1 v/v a temperatura ambiente per 90 minuti.

Il TFA è stato allontanato dalla resina mediante insufflazione di N₂, il PNA è stato precipitato su resina per trattamento con etere etilico a freddo. La resina è stata lavata con etere, l'oligomero è stato sciolto con una soluzione H₂O/CH₃CN al 50% , contenente 0.1%TFA e liofilizzato.

I PNA sono stati analizzati mediante HPLC analitico in fase inversa e purificati su colonna semipreparativa in fase inversa. L'identità dei prodotti è stata accertata mediante spettrometria di massa MALDI-TOF o ESI. Le frazioni pure sono poi state unite e quindi liofilizzate.

Il PNA110 è stato analizzato mediante HPLC analitico in fase inversa, utilizzando un gradiente crescente di acetonitrile (0.1% TFA) in acqua (0.1% TFA) dal 13 al 25% in 30 minuti e purificato su colonna semipreparativa in fase inversa utilizzando lo stesso gradiente. Il prodotto di reazione è stato caratterizzato mediante spettrometria di massa MALDI-TOF.

Massa calcolata: $[M+H]^+ = 3866,60 \text{ m/z}$

Massa osservata: $[M+H]^+ = 3867,58 \text{ m/z}$

Il PNA110bis di sequenza è stato analizzato mediante LC-MS e purificato su colonna semipreparativa in fase inversa utilizzando un gradiente crescente di acetonitrile (0.1% TFA) in acqua (0.1% TFA) dal 5 al 30% in 30 minuti. Lo spettro di massa multicarica ottenuto ha confermato l'identità del prodotto sintetizzato.

Masse calcolate: $[M + 3H]^{3+} = 1262.87 \text{ m/z}$; $[M + 4H]^{4+} = 947.40 \text{ m/z}$

Masse osservate: $[M + 3H]^{3+} = 1260.70 \text{ m/z}$; $[M + 4H]^{4+} = 946.10 \text{ m/z}$

Il PNA-TrKAIII è stato anch'esso analizzato mediante LC-MS e purificato su colonna semipreparativa in fase inversa utilizzando un gradiente crescente di acetonitrile (0.1% TFA) in acqua (0.1% TFA) dal 10 al 20% in 30 minuti. Lo spettro di massa multicarica ottenuto ha confermato l'identità del prodotto sintetizzato.

Masse calcolate: $[M + 2H]^{2+} = 1652.55 \text{ m/z}$; $[M + 3H]^{3+} = 1102.49 \text{ m/z}$;

$[M + 4H]^{4+} = 826.80 \text{ m/z}$

Masse osservate: $[M + 2H]^{2+} = 1652.70 \text{ m/z}$; $[M + 3H]^{3+} = 1102.50 \text{ m/z}$;

$[M + 4H]^{4+} = 827.50 \text{ m/z}$

Sintesi e purificazione dei coniugati PNA-peptide

La sintesi dei coniugati PNA-peptide è stata eseguita in fase solida su sintetizzatore automatico di PNA. L'oligomero di PNA è stato accresciuto sulla resina PAL-PEG funzionalizzata con il peptide utilizzando lo stesso protocollo descritto per la sintesi degli oligomeri di PNA non coniugati.

I coniugati sono stati distaccati per trattamento con una soluzione di TFA 78%, m-cresolo 20%, TIS 2% a temperatura ambiente per 3 ore.

Il coniugato PNA110/NLS è stato analizzato mediante HPLC analitico in fase inversa, utilizzando un gradiente crescente di acetonitrile (0.1% TFA) in acqua (0.1% TFA) dal 5 al 50% in 30 minuti. Il coniugato è stato purificato mediante HPLC semipreparativo in fase inversa, con lo stesso gradiente utilizzato per l'analitico e caratterizzato mediante spettrometria di massa MALDI-TOF.

Massa calcolata: $[M+H]^+ = 4859,97 \text{ m/z}$

Massa osservata: $[M+H]^+ = 4858,25 \text{ m/z}$

Il coniugato PNA110bis/NLS è stato analizzato mediante LC-MS e purificato su colonna semipreparativa in fase inversa utilizzando un gradiente crescente di acetonitrile (0.1% TFA) in acqua (0.1% TFA) da 0 al 40% in 30 minuti.

Masse calcolate: $[M + 3H]^{3+} = 1593.97 \text{ m/z}$; $[M + 4H]^{4+} = 1195.73 \text{ m/z}$;

$[M + 5H]^{5+} = 956.78 \text{ m/z}$

Masse osservate: $[M + 3H]^{3+} = 1591.73 \text{ m/z}$; $[M + 4H]^{4+} = 1193.73 \text{ m/z}$;

$[M + 5H]^{5+} = 956.06 \text{ m/z}$

Il coniugato TrKAIII-PNA/NLS è stato analizzato mediante LC-MS e purificato su colonna semipreparativa in fase inversa utilizzando un gradiente

crescente di acetonitrile (0.1% TFA) in acqua (0.1% TFA) dall'8 al 35% in 30 minuti.

Masse osservate: $[M+3H]^{3+} = 1430.9 \text{ m/z}$; $[M+4H]^{4+} = 1073.7 \text{ m/z}$;

$[M+5H]^{5+} = 859.6 \text{ m/z}$

Masse calcolate: $[M+3H]^{3+} = 1432.1 \text{ m/z}$; $[M+4H]^{4+} = 1075.0 \text{ m/z}$;

$[M+5H]^{5+} = 860.2 \text{ m/z}$

Il coniugato TrKAIII-PNA/D(AAKK)₄ è stato analizzato mediante LC-MS e purificato su colonna semipreparativa in fase inversa utilizzando un gradiente crescente di acetonitrile (0.1% TFA) in acqua (0.1% TFA) dall'8 al 35% in 30 minuti.

Massa calcolata: $[M+4H]^{4+} = 4859,97 \text{ m/z}$

Massa osservata: $[M+4H]^{4+} = 4858,25 \text{ m/z}$

2.4. Bibliografia

1. Mercatante, D.; Kole, R. *Pharmacology & Therapeutics*, **2000**, 85, 237-243.
2. a) Sazani, P.; Kole, R. *The Journal of Clinical Investigation*, **2003**, 112, 310-311. b) Sazani, P.; Kole, R. *The Journal of Clinical Investigation*, **2003**, 112, 481-486.
3. Kole, R.; Williams, T.; Cohen, L. *Acta Biochimica Polonica*, **2004**, 51, 373-378.
4. Schwartz, E.; Benz, Jr.; Forget, B. *Hematology: basic principles and practice*. 3rd edition., **2000**, 485-510.
5. Suwanmanee, T.; Sierakowska, H.; Lacerra, G. *Mol. Pharmacol.*, **2002**, 62, 545-553.
6. Dominski, Z.; Kole, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90, 8673-8677.
7. a) Sierakowska, H.; Sambade, M.J.; Agrawal, S.; Kole, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, 93, 12840-12844. b) Kole, R. *Applied Antisense Oligonucleotides Technology*, **1998**, 451-469, Wiley-Liss, New York. c) Sierakowska, H.; Sambade, M.J.; Schumperli, D.; Kole, R. *RNA*, **1999**, 5, 369-377.
8. Red, R.; Maniatis, T. *Cell*, **1985**, 41, 95-105.
9. Sazani, P.; Gemignani, F.; Kang, S.; Maier, M.A.; Manoharan, M.; Persmark, M.; Bortner, D.; Kole, R. *Nat. Biotechnol.*, **2002**, 20, 1228-1233.

10. Lewis, M.R.; Jia, F.; Gallazzi, F.; Wang, Y.; Zhang, J.; Shenoy, N.; Lever, S.Z.; Hannik, M. *Bioconjugate Chem.*, **2002**, 13, 1176-1180.
11. Andreu, D.; Albericio, F.; Solè, N.A.; Munson, M.C.; Ferrer, M.; Barany, G. *Peptide Synthesis Protocols*-Edited by Pennington NW, Dunn, B.M., Totowa, N.J., USA Humana press Inc., **1994**, 91-169.
12. Good, L.; Awasthi, S.K.; Dryselius, R.; Larsson, O.; Nielsen, P.E. *Nature Biotechnol.*, **2001**, 19, 360-364.
13. Neuner, P.; Gallo, P.; Orsatti, L.; Fontana, L.; Monaci, P. *Bioconjugate Chem.*, **2003**, 14, 276-281.
14. De Koning, M.C.; Filippov, D.V.; Meeuwenoord, N. *Synlett*, **2001**, 10, 1516-1518.
15. Zhuang, Y.; Weiner, A.M. *Genes Dev.*, 1989, 3, 1545-1552.
16. Bibel and Barde, 2000; Oppenheim, 1991; Hempstead et al., 1991; Martin-Zanca et al., 1989; Klein et al., 1991; Kaplan et al., 1991; Meakin and Shooter, 1991
17. Scaruffi et al., 1999
18. Azar et al., 1990
19. Neuroblastoma 2000; Iwata et al., 1994
20. Azar et al., 1994; Lavenius et al., 1995; Matsushima et al., 1990; Poluha et al., 1995; Edsjo et al., 2001; Lucarelli et al., 1997; Kim et al., 1999; Sugimoto et al., 2001; Hartman et al., 1994; Eggert et al., 2002
21. Tacconelli et al., 2004
22. Kaihatsu, K.; Huffman, K.E.; Corey, D.R. *Biochemistry*, **2004**, 43, 14340-14347.

CAPITOLO 3

3.1. Sintesi di monomeri di PNA modificati

Il secondo ma non meno importante obiettivo di questo lavoro è stata la sintesi e caratterizzazione di nuovi monomeri di PNA, al fine di ottenere nuove molecole di PNA con modifiche strutturali capaci di impartire al composto risultante proprietà chimico-fisiche migliorate, conservando, nel contempo, la capacità di interagire specificamente con il bersaglio attraverso i meccanismi di riconoscimento molecolare tipici degli acidi nucleici naturali.

Come già ampiamente descritto, i PNA si inseriscono perfettamente all'interno di un approccio terapeutico innovativo che coinvolge l'uso di oligonucleotidi sintetici per il trattamento di patologie per le quali ancora oggi non esistono terapie del tutto soddisfacenti. In virtù delle sue proprietà, infatti, il PNA può fungere da regolatore dell'espressione di un gene (ad esempio un oncogene) interferendo in processi quali la trascrizione (approccio antigene) o la traduzione (approccio antisense). Il PNA è potenzialmente un farmaco ideale dal punto di vista farmacodinamico per diversi motivi: i) generalmente il bersaglio è noto (DNA, mRNA o proteina); ii) tale bersaglio può essere riconosciuto con elevata affinità e specificità assoluta; iii) la resistenza alla degradazione enzimatica è fortemente incrementata; iv) il meccanismo d'azione è conosciuto nelle grandi linee. Tuttavia, vi sono problemi di natura farmacocinetica che ne limitano l'uso come farmaco, i principali dei quali

sono l'attraversamento delle barriere biologiche, la scarsa solubilità in acqua ed una tendenza all'autoaggregazione, il che fa sì che il PNA in soluzione non assuma una conformazione ben definita. Per superare questi problemi, è stato proposto l'uso di analoghi di PNA con modifiche strutturali sulle basi o sullo scheletro pseudopeptidico e/o coniugati con altre molecole a basso o medio peso molecolare. Tale settore di ricerca è particolarmente attivo e la recente letteratura è costellata di pubblicazioni che descrivono la sintesi e le proprietà di nuovi analoghi di PNA. Ovviamente, il lavoro sintetico deve essere affiancato da studi strutturali per verificare come le modifiche introdotte su un PNA rispetto alle molecole “classiche” influenzino capacità di riconoscere il bersaglio terapeutico e per progettare nuove variazioni strutturali più proficue.

Numerosi sono gli esempi riportati in letteratura di PNA modificati; tali modifiche riguardano le basi azotate, il “braccetto” che lega le basi allo scheletro pseudopeptidico e l'ossatura (sia a livello della cosiddetta porzione amminoacidica, che di quella amminoetilica) (figura 1).

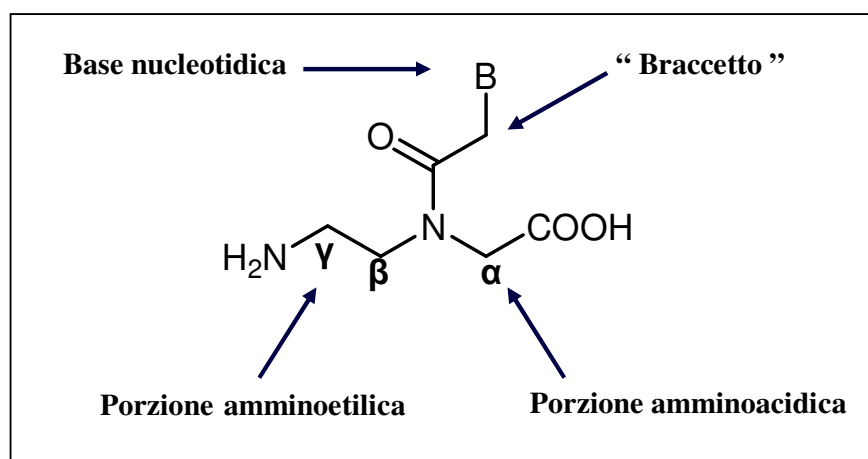


Fig 1. Possibili siti di modificazione su un monomero di PNA.

Gli esempi di PNA con modifiche a livello sia delle basi nucleotidiche che del gruppo metilencarbonile che connette lo scheletro alla base sono limitati se

paragonati al ricco repertorio dei PNA con modifiche a carico dello scheletro pseudopeptidico.

Basi nucleotidiche modificate possono essere utilizzate per interferire nei processi di ibridazione (figura 2). Ad esempio, una citosina benzoilata sull'azoto in posizione 4 (**1**) è in grado di inibire la formazione della triplex (PNA)₂/DNA per motivi di ingombro sterico.¹ La coppia di basi 2-tiouracile (**2**) e 2,6-diamminopurina (**3**) agisce sul riconoscimento tra PNA e DNA con un meccanismo peculiare noto come *double duplex invasion* che porta alla formazione di complessi dalla stechiometria (PNA)₂-(DNA)₂.² La sostituzione della citosina con la 5-metilcitosina (**4**) in una chimera PNA-DNA aumenta la stabilità della duplex, mentre la sostituzione della timina con il 5-bromouracile (**5**) non produce nessun effetto in termini di aumentata o diminuita stabilità; al contrario, l'introduzione simultanea delle due basi modificate **4** e **5** in una chimera PNA-DNA causa una destabilizzazione della tripla elica (DNA)₂/PNA-DNA se paragonata ad una triplex solo di DNA.³

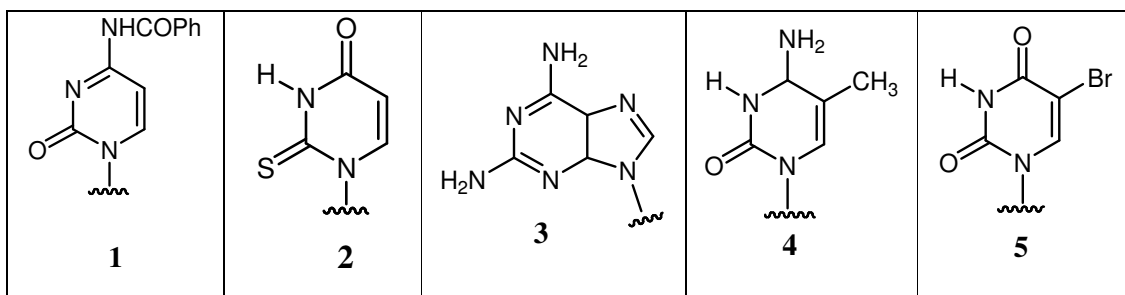


Fig. 2 Esempi di basi nucleotidiche modificate

Basi nucleotidiche modificate sono state progettate anche per l'ottenimento di PNA fluorescenti.⁴ Particolarmente interessante da questo punto di vista è l'arancio di tiazolo (figura 3), il quale, grazie alla sua peculiarità di appaiarsi efficientemente con tutte e quattro le basi nucleotidiche canoniche del DNA, mantiene inalterata la stabilità della duplex PNA/DNA.⁵

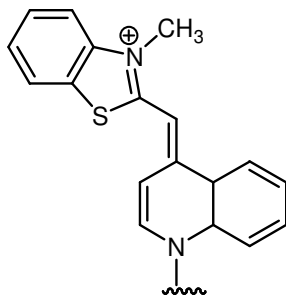


Fig. 3 Arancio di tiazolo.

Modifiche a livello del linker che connette la base nucleotidica allo scheletro hanno chiarito quanto il gruppo metilen carbonile sia importante ai fini della organizzazione strutturale di un oligomero di PNA e del processo di ibridazione. Infatti, la sostituzione con linker sia flessibili che rigidi ha portato sempre ad una destabilizzazione della duplex. Un effetto devastante sulle proprietà di legame del PNA si è osservato con la conversione del legame ammidico terziario nella corrispondente ammina terziaria (figura 4). L'abbassamento della temperatura di fusione è stato, infatti, di ben 22 °C.⁶

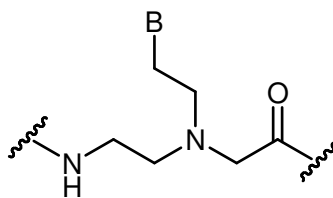


Fig. 4 Sostituzione del metilen carbonile con un linker etilenico, più flessibile.

Alla luce di questo risultato, la sostituzione del metilen carbonile con un gruppo funzionale isostrutturale, come il doppio legame C-C, non dovrebbe avere effetti drammatici sulla stabilità termica della duplex PNA/DNA. Tali analoghi prendono il nome di PNA olefinici (OPA) (fig. 5a) e sono stati sintetizzati sia nella stereochimica Z che E.⁷

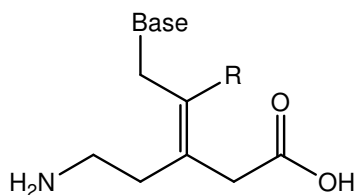


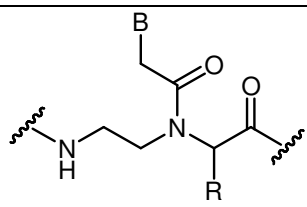
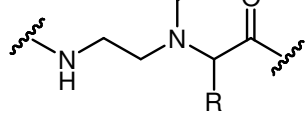
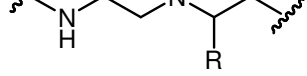



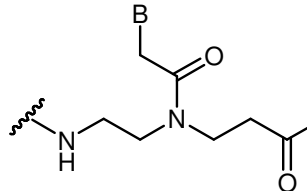
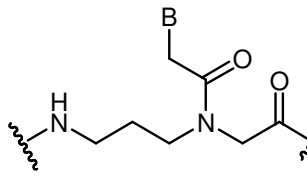
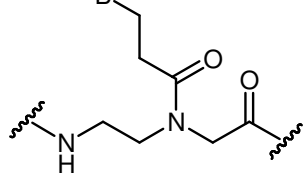
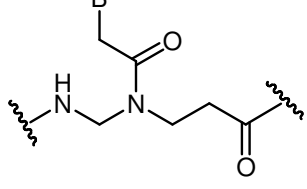
Fig. 5 Rappresentazione di un monomeo OPA a) $R=H$ b) $R=F$.

L'inserzione dei residui modificati di tipo E-OPA in un oligomero di PNA induce una forte propensione all'orientamento parallelo, che si accompagna, tuttavia, ad una incapacità nel formare triplex e ad un abbassamento della stabilità termica della duplex a causa della tendenza da parte di tali molecole ad autoaggregare. Al fine di ripristinare la natura dipolare del *linker* l'atomo di idrogeno del doppio legame è stato sostituito con un atomo di fluoro per dare gli F-OPA (fig. 5b).⁸ Anche gli F-OPA, come gli E-OPA, formano col DNA complementare duplex parallele, ma con stabilità termica ridotta rispetto ai classici PNA non modificati. I risultati mostrati evidenziano, dunque, che modifiche a livello del "braccetto" se da un lato possono portare ad un incremento nella selettività di *binding*, come negli E- e negli F-OPA, dall'altro causano sempre un abbassamento della stabilità della duplex.

Come già anticipato, la maggior parte delle modifiche apportate ai PNA hanno interessato lo scheletro pseudopeptidico. Le prime tra queste modifiche hanno interessato la porzione amminoacidica (anche detta glicinica o posizione α) ed hanno previsto la sostituzione dell'unità di glicina con altri α -amminoacidi (tabella 1, esempi **6a-e**)^{9,10} L'effetto sulle proprietà di ibridazione è modesto e nella maggior parte dei casi si osserva una lieve destabilizzazione della duplex con l'acido nucleico complementare, probabilmente ascrivibile all'ingombro sterico della catena laterale.¹¹ La stabilità della duplex è funzione della chiralità: i D-amminoacidi sembrano essere meglio tollerati rispetto a quelli con stereochimica L. Inoltre, la

presenza di centri chirali contribuisce ad incrementare la selettività nel riconoscimento del DNA complementare.¹² Ad esempio, l'incorporazione di tre monomeri di PNA derivatizzati sulla posizione α con catene laterali di D-lisina nella regione centrale di un oligomero di PNA si traduce in un aumento della specificità di riconoscimento del proprio partner ed in una migliore abilità nel discriminare tra orientamento parallelo ed antiparallelo.¹³ Al contrario, l'inserzione di un metilene in un qualunque punto del monomero (esempi **7-9**) ha avuto effetti drammatici sull'affinità di legame del PNA verso l'acido nucleico complementare.^{14,15} Analogamente, il cosiddetto PNA "retro-inverso" **10**, in cui i legami ammidici tra i monomeri sono invertiti, non è in grado di formare duplex stabili.¹⁶

Tabella 1 Effetto delle modificazioni sulle proprietà di ibridazione del PNA.

PNA modificato	ΔT_m^a		
	PNA	R=H	0.0 °C (51.0 °C)
	6a D-Ala	R=CH₃	-1.0 °C
	6b L-Ala	R=CH₃	-4.0 °C
	6c D-Lis	R=(CH₂)₄NH₂	+1.0 °C
	6d L-Lis	R=(CH₂)₄NH₂	-0.6 °C
	6e D-Ser	R=CH₂OH	-1.0 °C
	7		-20 °C ^b
	8		-8.0 °C ^b
	9		-10 °C ^b
	10 Retro-inverso		-6.5 °C ^b

^a Variazione della T_m per monomero di PNA modificato in un decamero di sequenza H-gtagatcact-NH₂ dopo ibridazione con il DNA complementare. *t* indica il monomero modificato. ^b La sequenza di PNA è H-gtagatcact-NH₂.

PPNA, PHONA, PGNA, PAGNA sono un'altra classe di analoghi di PNA in cui il legame peptidico dello scheletro è stato sostituito da legami di altra natura, come esterea o fosfodiesterica, o convertito in un'ammina secondaria

(PANA).¹⁷⁻²¹ I fosfono PNA (PPNA) (fig. 6, **11**) si sono rivelati un utile espediente per assicurare una maggiore solubilità in acqua, anche se l'affinità con cui legano il bersaglio è più bassa a causa della repulsione elettrostatica tra i gruppi fosfato del PPNA e quelli del DNA o RNA. Al contrario, la conversione del legame peptidico in ammina secondaria (PANA, acido poliammino nucleico) (fig. 6, **12**) non produce nessun effetto destabilizzante sulla risultante duplex PNA/DNA.²² L'analisi delle proprietà di ibridazione di oligomeri di PNA contenenti tali modifiche suggerisce che una rigidità a livello dei legami intramonomerici non è strettamente necessaria e che l'introduzione di gruppi carichi, come il gruppo fosfato, può contribuire sensibilmente ad aumentare la solubilità e la capacità di internalizzazione in cellula di questi composti.

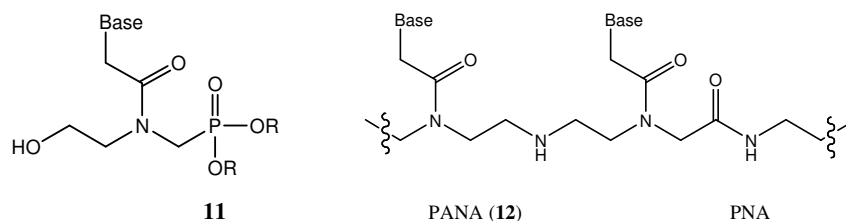


Fig. 6 Esempi di analoghi di PNA in cui il legame ammidico secondario è stato convertito, rispettivamente, ed in un legame fosfodiesterico (**11**) ed in un'ammina secondaria (**12**).

Un'altra classe di analoghi di PNA ampiamente investigata è quella dei cosiddetti “analoghi di PNA conformazionalmente costretti” il cui scheletro presenta maggiore rigidità in seguito all'introduzione di cicli a 3-, 5- e 6-membri.^{23,24} La progettazione di PNA “costretti” ha come finalità quella di indurre una preorganizzazione strutturale dell'oligomero di PNA nella giusta conformazione di *binding* al DNA o RNA. Infatti, la totale assenza di centri chirali e di cariche elettrostatiche induce minori restrizioni conformazionali sul PNA se paragonato all'RNA o al DNA, il che fa sì che il PNA in soluzione non assuma una conformazione ben definita. E' ragionevole,

pertanto, ipotizzare che aumentando il numero dei vincoli conformazionali si possa indurre una organizzazione strutturale che, a sua volta, si dovrebbe tradurre in una stabilizzazione della duplex PNA/DNA. L'introduzione di nuovi centri chirali e di altri possibili sostituenti sull'anello hanno permesso la preparazione di librerie di regio- e stereo-isomeri. Esempi di PNA “bloccati”, riportati in figura 7, sono l'amminoprolile (ap-PNA, **13**), l'amminoetilprolile (aep-PNA, **14**), l'amminoetilpirrolidinone (aepone-PNA, **15**), il ciclopropile (cpr-PNA, **16**), il ciclopentile (cp-PNA, **17**) ed il cicloesile (ch-PNA, **18**).

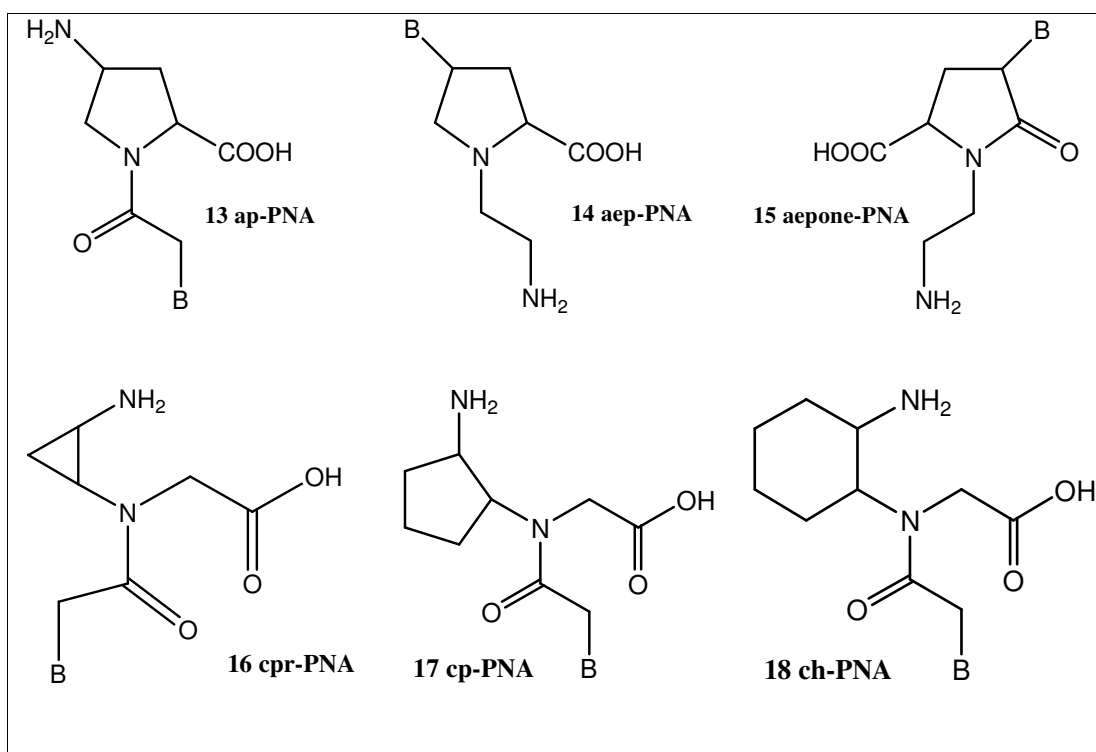


Fig. 7 Esempi rappresentativi di analoghi di PNA conformazionalmente “costretti”.

L'introduzione di sistemi ciclici produce vincoli conformazionali e centri chirali la cui stereochimica si è vista essere cruciale per le proprietà di ibridazione dei risultanti oligomeri. Ad esempio, l'introduzione dell'isomero trans del ciclopropil-PNA (tcpr-PNA) all'interno di una sequenza di PNA

compromette la stabilità della duplex con il DNA.²⁵ L'enantiomero 1R2S del ciclopentil-PNA (cp-PNA) forma complessi con il DNA con un'affinità maggiore rispetto all'enantiomero 1S2R.²⁶ Allo stesso modo, la sintesi di tutti e quattro gli stereoisomeri del cicloesil-PNA (1S2S, 1R2R, 1S2R, 1R2S) ed i successivi studi sulle proprietà di ibridazione hanno mostrato che l'introduzione dell'isomero RR ha effetti destabilizzanti su duplex PNA/DNA(RNA), mentre gli altri isomeri non influenzano la stabilità termica dei risultanti complessi.²⁷ Interessanti studi di ibridazione sono stati condotti anche sui pirrolidinil-PNA (figura 8, **19-20**). Sono stati sintetizzati gli isomeri (2R,4R) e (2S,4S) ed incorporati in un PNA decamero omotiminico. Tuttavia, gli esperimenti UV e CD hanno rivelato che nessuno dei due isomeri è in grado di legare la sequenza di acido nucleico complementare. Molto probabilmente, la razionalizzazione di tale risultato va ricercata nel fatto che entrambi gli isomeri formano strutture secondarie stabili che ne impedirebbero il legame con il DNA o l'RNA complementare.^{28,29}

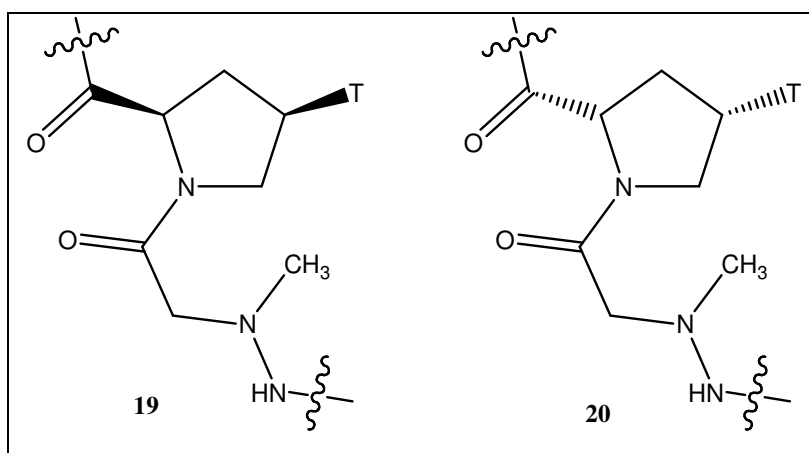


Fig. 8 Struttura dei pirrolidinil-PNA

Al fine di migliorare le proprietà farmacocinetiche dei PNA, Nielsen ed i suoi collaboratori hanno sintetizzato oligomeri di PNA glicosilati, ottenuti

rimpiazzando l'unità glicinica con L-amminoacidi (quali serina, treonina, lisina ed acido aspartico) ed ancorandone alla catena laterale un residuo zuccherino (N-acetilgalattosammina, galattosio e mannosio), in modo da consentire l'interazione degli oligomeri con quei recettori cellulari che riconoscono substrati glicosilati e migliorarne, quindi, la biodistribuzione. Tali modificati riconoscono la sequenza di acido nucleico complementare con selettività ma con affinità minore, come testimoniato dall'abbassamento della temperatura di fusione ($\Delta T_m \leq -6^\circ\text{C}$ per residuo zuccherino).³⁰

Nell'ambito delle modifiche apportate allo scheletro di PNA, scarsa attenzione è stata, invece, dedicata alla posizione γ . I lavori riportati in letteratura sono solo recenti ma hanno subito messo in evidenza, con piacevole sorpresa, che, mentre la stragrande maggioranza delle modifiche sopra menzionate ha avuto effetti deleteri sulle proprietà di *binding* del risultante oligomero di PNA, l'introduzione di una catena laterale nella posizione γ non compromette il legame con il DNA.³¹⁻³³ Ad esempio, la funzionalizzazione della posizione γ con un gruppo butilamminico, tale, quindi, da mimare la catena laterale di una lisina, non solo non inficia la formazione di duplex PNA/DNA, ma addirittura porta ad un lieve aumento della stabilità termica del complesso formato. Inoltre, tali caratteristiche si conservano anche se si funzionalizza ulteriormente il gruppo amminico della catena laterale di lisina con molecole abbastanza ingombranti, quali fluorofori.³⁴ Alla luce di questi incoraggianti risultati, un secondo interessante obiettivo del lavoro di tesi è stata la progettazione, sintesi e caratterizzazione di analoghi di PNA recanti catene laterali di tipo amminoacidico. Sono stati progettati, in particolare, due monomeri di PNA derivatizzati sulla posizione γ dello scheletro pseudopeptidico con un gruppo mercaptometile, in un caso (fig. 9a) e con uno idrossimetile nell'altro (fig. 9b), tali da mimare, rispettivamente, una cisteina ed una serina.

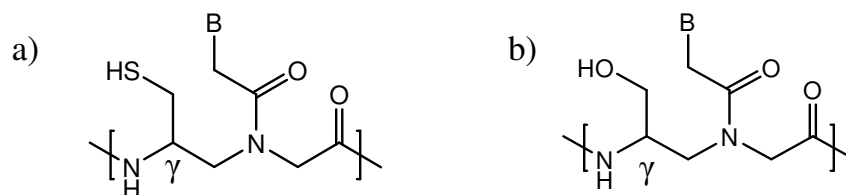


Fig. 9 Chemical structure of a) L-cysteine and b) L-serine derived γ PNA (L Cys- γ PNA and L Ser- γ PNA).

3.1.a Sintesi e caratterizzazione di un monomero di PNA derivatizzato sulla posizione γ dello scheletro pseudopeptidico con un gruppo mercaptometile

I protocolli standard attualmente in uso per la sintesi chimica dei PNA forniscono gli oligomeri desiderati generalmente senza particolari difficoltà e con buona resa. Tuttavia, in quei casi in cui la sequenza da sintetizzare contenga estesi tratti polipurinici o un numero di unità monomeriche elevato (≥ 20) diventa difficile, se non impossibile, ottenere un prodotto omogeneo in seguito a fenomeni di aggregazione della catena polimerica in crescita.³⁵ Analoghi inconvenienti si presentano nella sintesi di sistemi misti, quali coniugati PNA-peptide. All'aumentare, infatti, della lunghezza del coniugato, le rese di accoppiamento si abbassano progressivamente, il numero di sequenze troncate aumenta, la purificazione diventa più complessa, la resa finale si abbassa. Una conveniente alternativa alla sintesi *stepwise*, che prevede il sequenziale accoppiamento dei residui su supporto solido, può essere quella di sintetizzare dapprima due frammenti di PNA di dimensioni minori (o separatamente il PNA ed il peptide) e successivamente procedere alla loro “unione” sfruttando una reazione di transtioesterificazione e riarrangiamento. Tale strategia va sotto il nome di “native chemical ligation” (NCL).

La “*Native Chemical Ligation*” è stata introdotta nel 1994 da Kent e collaboratori e permette di ottenere legami ammidici nativi nel sito di coniugazione. La reazione della NCL è basata sulla reazione di transtioesterificazione tra un tioestere in posizione C-terminale e la catena laterale di un residuo di cisteina in posizione N-terminale. Dopo una prima transtioesterificazione selettiva, i due frammenti riarrangiano a formare il legame ammidico, ottenendo così lo scheletro nativo.³⁶ In figura 10 è rappresentato il meccanismo di tale reazione.

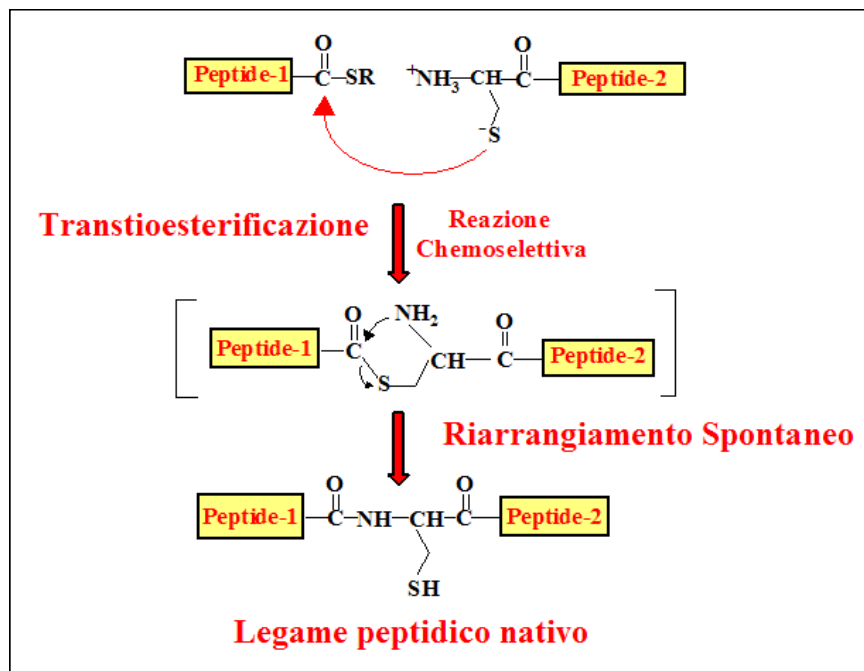


Figura 10 Schema generale della strategia NCL proposta da Kent e collaboratori.

Tale approccio, altamente innovativo, permette di condurre le reazioni in soluzione acquosa a pH neutro, in presenza di agenti riducenti, ma soprattutto in presenza di altre eventuali cisteine presenti all'interno dei due polipeptidi da coniugare. Il vantaggio principale di questa strategia consiste, infatti, nella possibilità di utilizzare frammenti completamente deprotetti; inoltre, le

reazioni possono essere condotte in tamponi o in solventi organici a seconda della solubilità dei substrati. La *native chemical ligation* è per questi motivi riconosciuta come procedura fondamentale nella sintesi chimica delle proteine ed è stata estesa anche alla sintesi di lunghi peptidi.

Per poter ottenere coniugati PNA-peptide mediante chemical ligation è necessario che il PNA sia funzionalizzato con una catena laterale di cisteina all'estremità N-terminale e che il peptide sia derivatizzato come tioestere al C-terminale. Allo stesso modo, la condensazione tra due frammenti di PNA può avvenire in seguito a reazione di un frammento modificato al C-terminale con un tioestere e un frammento che contenga all'estremità N-terminale un monomero di PNA che mimi la situazione di una cisteina N-terminale.

L'introduzione di una catena laterale di tipo cisteinico può essere interessante anche ai fini della sintesi di PNA fluorescenti. Molte applicazioni in diagnostica e biologia molecolare richiedono, infatti, la marcatura di acidi nucleici con fluorofori.³⁶ Il gruppo mercaptometile, grazie alla sua elevata nucleofilicità, si presta molto bene per tale scopo. Può fungere, infatti, da "braccio" per derivatizzazioni post-sintetiche; può essere, pertanto, usato in reazioni di sostituzione nucleofila, anche in presenza della funzione amminica terminale libera, per l'introduzione di fluorofori in oligomeri di PNA, in seguito a reazione con elettrofili *soft* come i derivati dell'acido iodoacetico (ad esempio la 5-iodo-acetamidofluoresceina).

In virtù della spiccata versatilità del gruppo mercaptometile, la scelta di una catena laterale di tipo cisteinico appare, dunque, fortemente allettante. Tuttavia, se si introducesse semplicemente un residuo di cisteina all'estremità N-terminale o in un punto qualunque dell'oligomero di PNA, si indurrebbe una distorsione a livello del filamento di PNA con conseguente riduzione dell'affinità di legame verso l'acido nucleico bersaglio. Di qui, la necessità di sviluppare una strategia sintetica volta all'ottenimento di un monomero di

PNA modificato con un gruppo mercaptometile in catena laterale, così da non compromettere la geometria del *backbone*.

Per semplicità è stato sintetizzato un monomero avente per base eterociclica la timina (figura 11), ma la procedura può essere utilizzata per ottenere monomeri con tutte le altre basi.

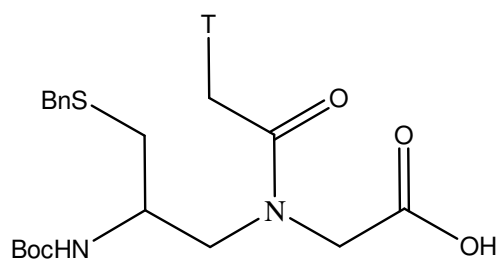


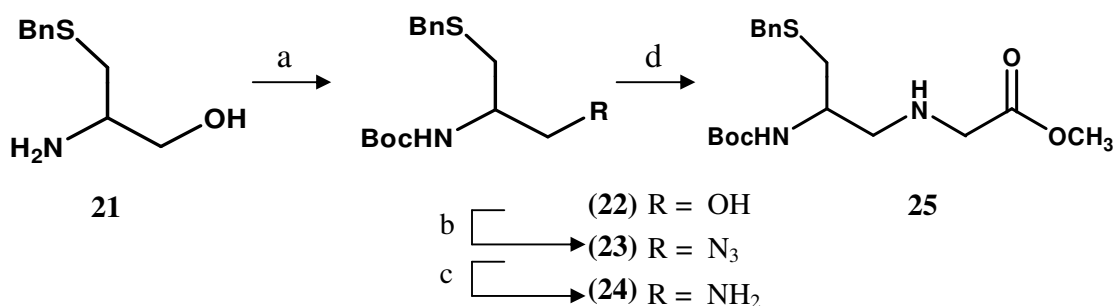
Fig. 11 Monomero di PNA derivatizzato in posizione γ con un gruppo mercaptometile.

La strategia sintetica messa a punto prevede la condensazione di uno scheletro di PNA modificato con una base eterociclica opportunamente derivatizzata.

La sintesi dello scheletro modificato, a partire dal cisteinolo (**21**), prevede i seguenti passaggi:

- protezione della funzione amminica terminale con il gruppo Boc;
- trasformazione del gruppo ossidrilico (**22**) in azide (**23**);
- riduzione dell'azide (**23**) ad ammina (**24**);
- reazione dell'ammina (**24**) con metilbromoacetato per dare (**25**) (schema 1).

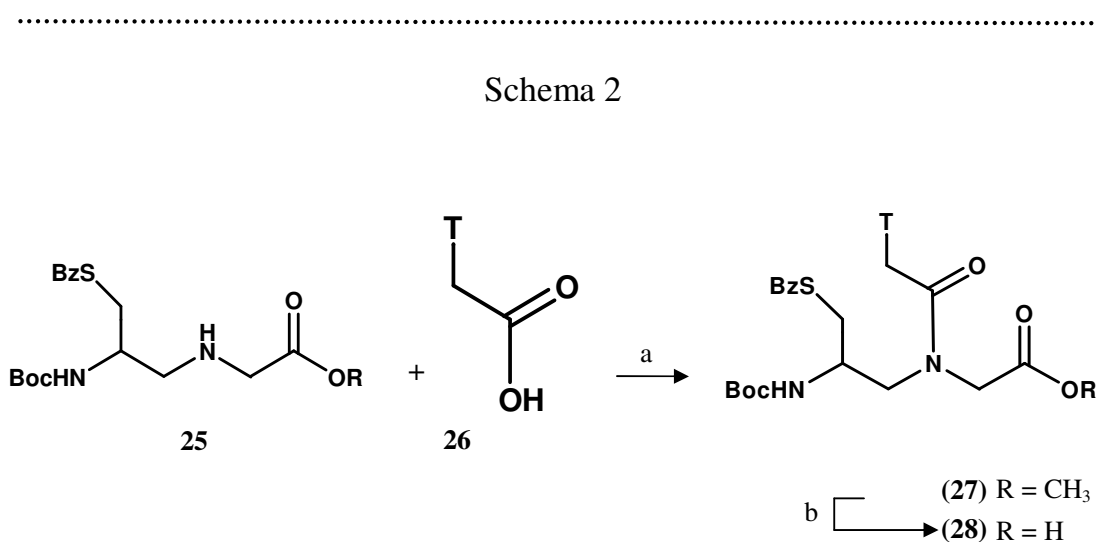
Schema 1



Reagenti e condizioni: a) Boc₂O, TEA, 98%; b) PPh₃, NaN₃, CCl₄/DMF 72%;
c) H₂, Pd/C 100%; d) BrCH₂COOCH₃, 55%.

E' stato utilizzato come prodotto di partenza un derivato della cisteina commercialmente disponibile, S-benzil-cisteinolo. Tale derivato poteva essere ottenuto, in alternativa, in seguito a riduzione del gruppo carbossilico della cisteina utilizzando procedure riportate in letteratura.³⁷ Il cisteinolo è stato protetto sulla funzione amminica terminale con il gruppo terzbutossicarbonile (Boc), acido labile, mediante reazione con Boc-anidride in presenza di TEA. La reazione è stata quantitativa. La trasformazione del gruppo OH libero in azide è stata eseguita mediante una reazione *one-pot* condotta in CCl₄ /DMF (1:4 v/v), in presenza di sodio azide e trifenilfosfina.³⁸ Questa reazione è utilizzata per la trasformazione di alcoli in azidi o ammine, passando attraverso il cloro-derivato. La trifenilfosfina è utilizzata sia per la reazione di clorurazione, sia per la riduzione dell'azide ad ammina. Numerosi tentativi di ottenere direttamente l'ammina dall'alcol, utilizzando un diverso numero di

equivalenti di fosfina o cambiando il tipo di fosfina, non sono riusciti. La reazione ha portato solo all'ottenimento dell'azide. La riduzione dell'azide in ammina è stata ottenuta in seguito ad idrogenazione catalitica, in presenza di un catalizzatore, quale palladio su carbonio. L'ammina ottenuta è stata poi messa a reagire con metilbromoacetato, per ottenere lo scheletro completamente protetto. Quest'ultimo è stato quindi accoppiato con la timina opportunamente funzionalizzata (schema 2, **26**), sintetizzata seguendo procedure riportate in letteratura.³⁹ La timina derivatizzata è stata quindi accoppiata al nuovo *backbone* utilizzando EDC come agente accoppiante per ottenere il monomero (**27**), la cui funzione esterea è stata infine liberata per trattamento con una soluzione acquosa di NaOH 2M per dare il corrispondente acido carbossilico (**28**) (schema 2).



Reagenti e condizioni: a) EDC, DMAP, 97%; b) NaOH 2M, 87%.

.....

Il nuovo monomero presenta un centro chirale; la strategia non prevede reazioni che alterano la chiralità del centro stereogenico. A conferma di ciò, sul *backbone* **25** sono state effettuate misure del potere ottico rotatorio. Tutti i prodotti sono stati caratterizzati mediante NMR ^1H e ^{13}C ed elettrospray. Di seguito è riportato lo spettro di massa ESI del monomero finale di PNA **28** (fig. 12).

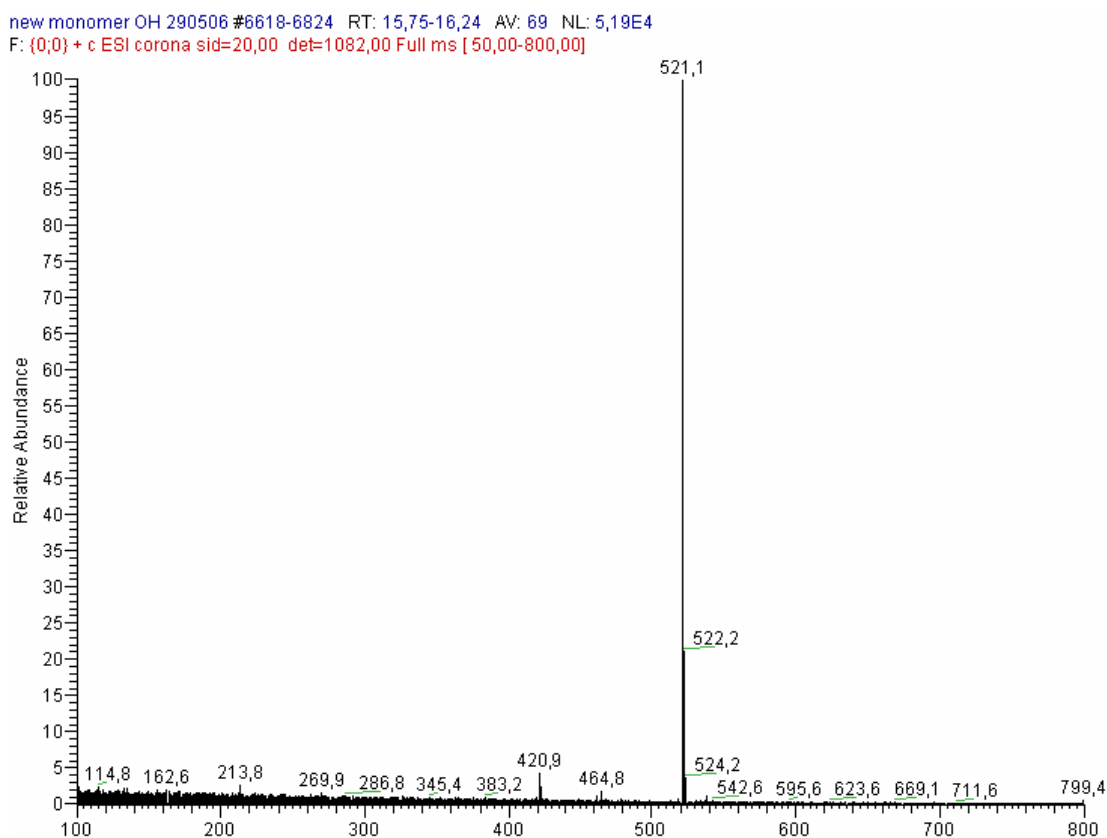


Fig. 12 Spettro LCMS multicarica del monomero finale di PNA con catena laterale di cisteina.

Il monomero così sintetizzato può essere utilizzato per la sintesi in fase solida di oligomeri di PNA. In particolare, se posto all'N-terminale della catena, può essere utile per l'ottenimento di coniugati PNA-peptidi o PNA lunghi in seguito alla reazione con un peptide o un PNA tioestere al C-terminale.

L'inserimento del monomero all'estremità N-terminale o anche all'interno della catena oligomerica può, inoltre, essere sfruttato per l'introduzione di gruppi fluorescenti, sfruttando l'elevata nucleofilicità del gruppo tiolico.

3.1.b Sintesi e caratterizzazione di un monomero di PNA derivatizzato sulla posizione γ dello scheletro pseudopeptidico con un gruppo idrossimetile

Numerosi studi dimostrano che oligonucleotidi sintetici a doppio filamento possono essere usati per alterare la trascrizione dei geni attraverso un approccio decoy.⁴⁰ Tuttavia, la presenza di DNasi intracellulari limita fortemente l'uso degli acidi nucleici naturali in applicazioni decoy⁴¹ ed impone il ricorso a grandi quantità di DNA da internalizzare nelle cellule bersaglio.⁴² Oligonucleotidi modificati, come i metilfosfonati ed i fosforotioati, sono stati proposti come alternativa agli oligo classici in virtù della loro maggiore resistenza all'idrolisi enzimatica, tuttavia tali molecole possiedono un grado di tossicità assai elevato⁴³ e presentano anche una serie di effetti aspecifici che ne limitano sensibilmente l'utilizzo.⁴²

I PNA, grazie alle loro interessanti proprietà chimico-fisiche e biologiche, hanno dimostrato di essere molecole potenzialmente utilizzabili in tutte quelle applicazioni biochimiche che richiedono un riconoscimento selettivo ed efficiente di specifiche sequenze di acidi nucleici.

I numerosi esempi riportati in letteratura hanno confermato come i PNA siano candidati adatti ad affrontare i problemi legati alle applicazioni terapeutiche mirate al controllo dell'espressione genica (strategie antigene ed antisense, correzione di splicing aberrante). Si sono, infatti, dimostrati efficaci nell'inibizione e/o nella regolazione dell'espressione di svariati geni. Poche

informazioni, invece, sono fino ad ora disponibili sul possibile uso dei PNA come molecole decoy. Studi biologici sull'interazione tra PNA a doppia elica e ibridi PNA/DNA con il fattore di trascrizione NF-kB hanno evidenziato che sequenze specifiche per NF-kB di tipo PNA/PNA e PNA/DNA non sono in grado di stabilire interazioni stabili con proteine che riconoscono i siti di legame di NF-kB in sequenze genomiche.⁴⁴

Simulazioni di dinamica molecolare hanno mostrato che l'interazione tra duplex di PNA ed il fattore di trascrizione NF-kB non ha luogo per svariate ragioni.⁴⁵ La mancanza di siti donatori/accettori di legami idrogeno, l'assenza di gruppi carichi e le peculiari caratteristiche strutturali, significativamente differenti da quelle della doppia elica del DNA, impediscono al PNA di instaurare una corretta ed efficace interazione con molecole proteiche che legano il DNA, rendendolo, pertanto, poco idoneo per un approccio di tipo *decoy*.

Per poter essere utilizzati in applicazioni in vivo, gli oligonucleotidi decoy devono mantenere una conformazione tridimensionale tale da legare specificamente e con la più alta affinità possibile il *target* molecolare, devono avere una ragionevole stabilità nell'intorno fisiologico (o patologico) di interesse e devono essere facilmente sintetizzati in quantità sufficiente per l'uso clinico. Per cercare di soddisfare ai requisiti imposti nei punti precedenti, sono state progettate molecole costituite da blocchi di diversa natura chimica legati covalentemente. Lo scopo è stato quello di ottenere molecole con buone proprietà di trasporto ed elevata stabilità alla degradazione enzimatica. Tali molecole prendono il nome di chimere PNA-DNA e, ad oggi, sono le uniche ad apparire come reagenti di grande interesse per la terapia genica in un approccio di tipo *decoy*.^{46,47} Chimere PNA-DNA-PNA mimanti i siti di *binding* del fattore nucleare kB (NF-kB) hanno mostrato di essere capaci di dare interazioni stabili con NF-kB p52/p50 e con

fattori nucleari da cellule linfoidi B. Il disegno delle chimere per NF-Kb è stato eseguito con l'utilizzo di tecniche di dinamica molecolare per prevedere l'interazione con le proteine nucleari della famiglia di NF-kB. In figura 53 è mostrato il modello tridimensionale del doppio filamento chimerico PNA-DNA-PNA progettato. E' stato, altresì, dimostrato che ibridi tra DNA e chimere PNA-DNA-PNA e doppi filamenti chimerici mimanti i siti di legame di NF-kB di HIV-1, sono in grado di sopprimere le interazioni molecolari tra HIV-1 LTR e p50, p52 e fattori nucleari da cellule linfoidi B. I risultati ottenuti dimostrano chiaramente che le chimere disegnate possono essere proposte come potenti molecole decoy in terapia genica.

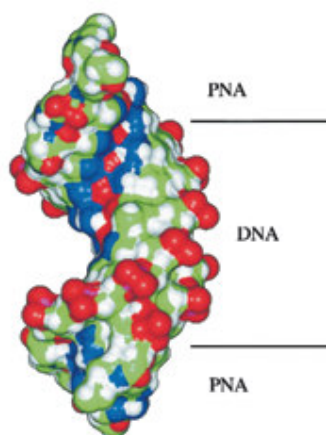


Fig. 13 *Modello tridimensionale del doppio filamento chimerico PNA-DNA-PNA progettato.*

Nonostante gli incoraggianti risultati, le chimere PNA-DNA non hanno avuto molta fortuna in quanto la loro sintesi è veramente complessa e assai costosa. I monomeri classici di PNA, commercialmente disponibili, non sono utilizzabili, in quanto l'ambiente fortemente acido richiesto per la rimozione dei gruppi protettori e per il distacco dalla resina causerebbe depurinazione della porzione di DNA. L'uso di gruppi protettori alternativi,⁴⁸ se da un lato

ha risolto i problemi sintetici connessi alla sintesi *on line* di coniugati PNA-DNA, dall'altro richiede svariati e laboriosi passaggi sintetici.

Ricordando che in natura l'interazione DNA/proteina è per lo più mediata dalla formazione di legami idrogeno e da interazioni elettrostatiche tra i gruppi fosfato e gli amminoacidi carichi, sarebbe auspicabile introdurre siti donatori/accettori di legami H e/o unità cariche nello scheletro di PNA. Di qui l'idea di progettare un nuovo monomero di PNA che fosse derivatizzato sulla posizione γ dello scheletro pseudopeptidico con un gruppo di tipo idrossimetile, tale quindi da mimare una catena laterale di serina (figura 14).

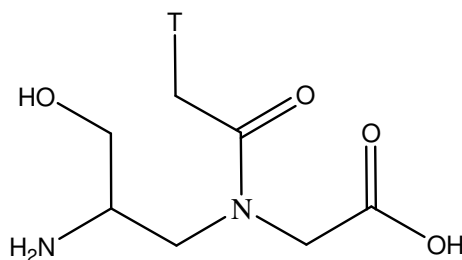


Fig. 14 Monomero di PNA derivatizzato in posizione γ con un gruppo idrossimetile.

Questa idea è stata corroborata da studi di modellistica molecolare, utili per prevedere il comportamento di PNA modificati e per guidare la progettazione di nuovi derivati. In particolare, sono state effettuate simulazioni di dinamica molecolare sul complesso formato tra il fattore di trascrizione NF-kB e una duplex PNA/DNA contenente due monomeri consecutivi di PNA derivatizzati con il gruppo idrossimetile (figura 15). Grazie alla capacità del gruppo ossidrile di formare legami a idrogeno, si vengono ad instaurare interazioni con le catene laterali di alcuni amminoacidi del fattore di trascrizione. Questa caratteristica può, dunque, costituire un importante mezzo per aumentare l'affinità dei fattori di trascrizione per molecole basate su duplex PNA/DNA.

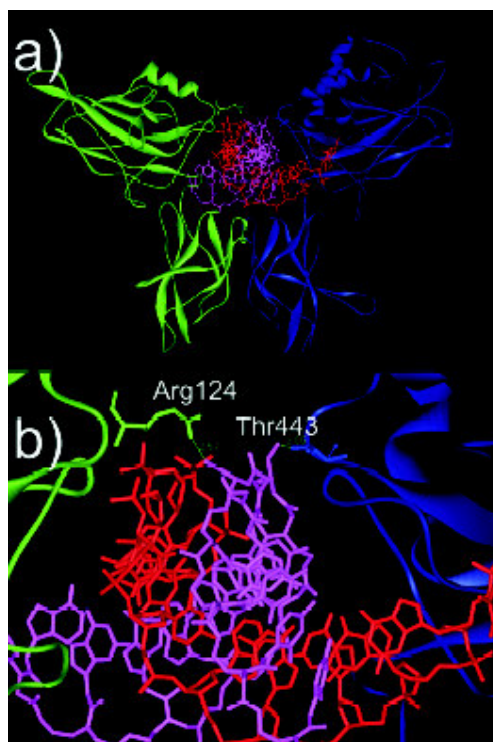


Fig. 15 *a)* Struttura del complesso tra il fattore di trascrizione NF- κ B e una duplex PNA/DNA con due monomeri consecutivi di PNA derivatizzati con il gruppo idrossimetile, ottenuta mediante studi di dinamica molecolare. Il filamento di PNA è rappresentato in viola, quello di DNA in rosso. *b)* Ingrandimento dei legami idrogeno intermolecolari tra i gruppi idrossimetilici del PNA e le catene laterali di alcuni amminoacidi del fattore di trascrizione.

Il nuovo monomero presenta un centro chirale: la scelta di una stereochimica di tipo L è fondamentale, perché è quella che garantisce la migliore disposizione spaziale della catena laterale, come predetto da simulazioni di dinamica molecolare (fig 16).

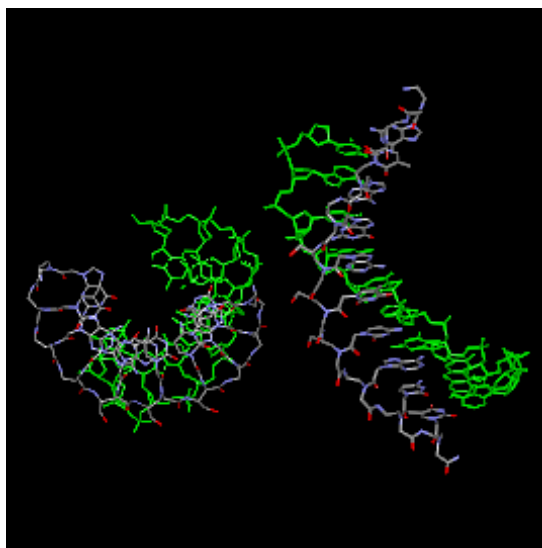
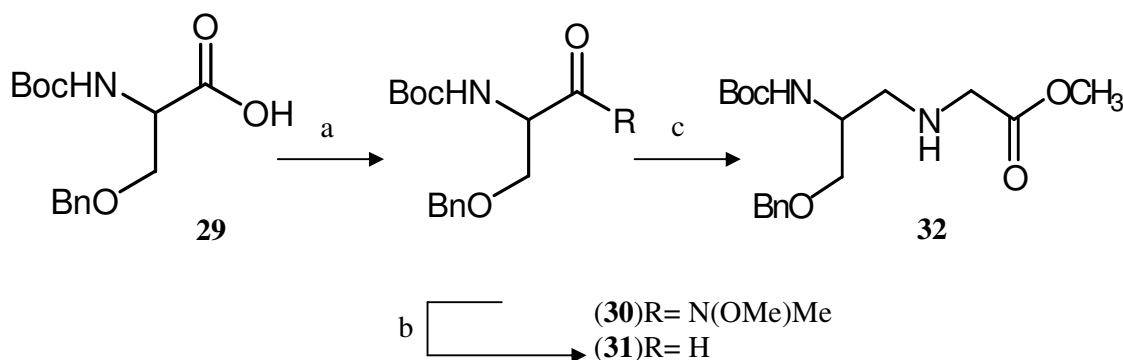


Fig. 16 *Struttura di una duplex PNA/DNA contenente, nella regione centrale di un decamero di PNA, tre residui modificati in posizione γ , ottenuta mediante studi di dinamica molecolare.*

Per la sintesi del nuovo monomero di PNA si è pensato di utilizzare una strategia simile a quella messa a punto per la sintesi del monomero di PNA analogo della cisteina. Essa, ricordiamo, prevede la condensazione di uno scheletro di PNA modificato con una base eterociclica opportunamente derivatizzata. L'analisi retrosintetica dello scheletro modificato mostra come esso possa essere ottenuto dalla Boc/Bn serina, amminoacido commercialmente disponibile, attraverso i seguenti passaggi: 1) riduzione della funzione carbossilica ad alcool; 2) trasformazione del gruppo ossidrilico in azide mediante trattamento con $\text{PPh}_3/\text{NaN}_3$ in CCl_4/DMF ; 3) riduzione dell'azide ad ammina mediante idrogenazione catalitica su carbone palladiato; 4) reazione dell'ammina con metilbromoacetato. Sfortunatamente, tale strategia applicata alla sintesi del monomero di PNA analogo della serina si è rivelata insoddisfacente. Una volta, infatti, trovate le migliori condizioni di reazione per la riduzione della funzione carbossilica ad alcolica, l'ottenimento della corrispondente azide si è fermato a rese troppo basse: svariate prove

effettuate a varie condizioni di temperatura hanno portato ad una resa finale solo del 35%. Per l'ottenimento del monomero modificato è stata, pertanto, adottata una strategia sintetica alternativa.⁴⁹ La sintesi prevede la trasformazione della Boc/Bn serina (**29**) nella cosiddetta “ammide di Weinreb” (**30**) per reazione con la N,O-dimetilidrossilammina cloridrato. La successiva riduzione con idruro di litio e alluminio fornisce la corrispondente aldeide (**31**) in buona resa. L'aldeide è poi sottoposta ad amminazione riduttiva con glicina metilestere per dare lo scheletro modificato (**32**) (schema 3).

Schema 3



Reagenti e condizioni: a) HCl·HNMe(OMe), DMAP, TEA, EDC 98%;

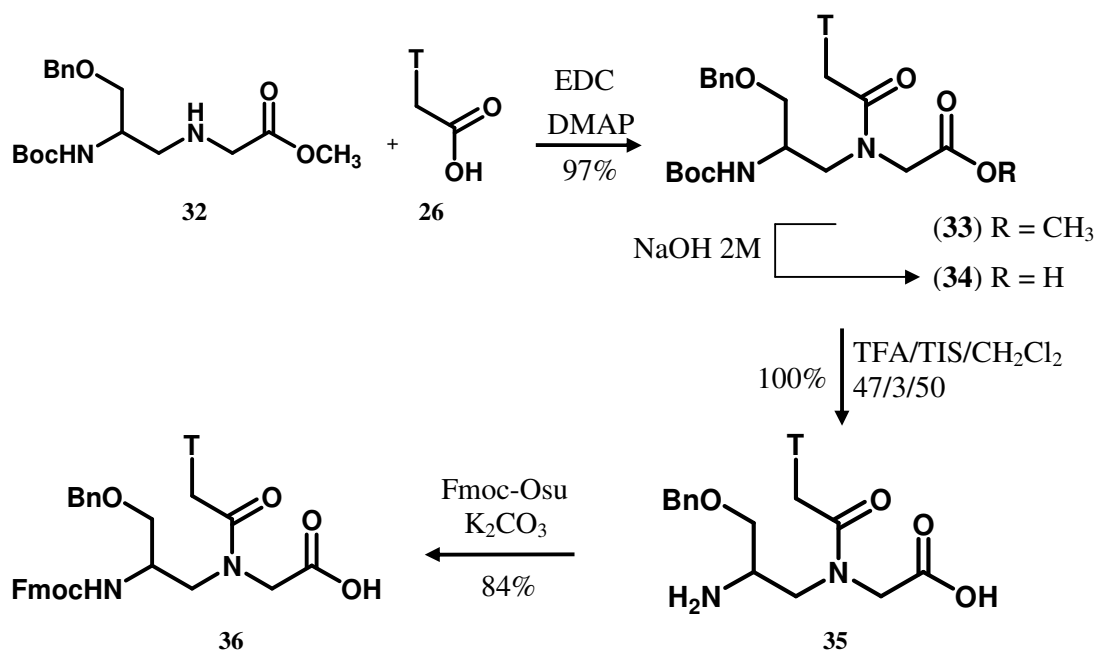
b) LiAlH₄, THF 85%;

c) NaB(OAc)₃H, Gly-OMe, THF/DCE 1.5/1 55%.

Il monomero protetto (**33**) è successivamente ottenuto mediante condensazione dello scheletro (**32**) con la base eterociclica derivatizzata (**26**). Per semplicità è

stato sintetizzato un monomero avente per base eterociclica la timina, ma la procedura può essere utilizzata per ottenere monomeri con tutte le altre basi. L'idrolisi della funzione esterea con NaOH per liberare il gruppo carbossilico (**34**), la rimozione del Boc (**35**) e successiva protezione con Fmoc del gruppo amminico forniscono, infine, il monomero desiderato (**36**) (schema 4).

Schema 4



Tutti i prodotti sono stati caratterizzati mediante NMR (¹H e ¹³C) ed elettrospray. Di seguito è riportato lo spettro di massa ESI del monomero finale di PNA **36** (fig. 17).

Tm controllo massa170407 #10 RT: 0.11 AV: 1 SB: 33 0.00-0.10, 0.15-1.96 NL: 3.46E5
F: [0.0] + c ESI corona sid=30.00 del=1247.00 Full ms [100.00-1000.00]

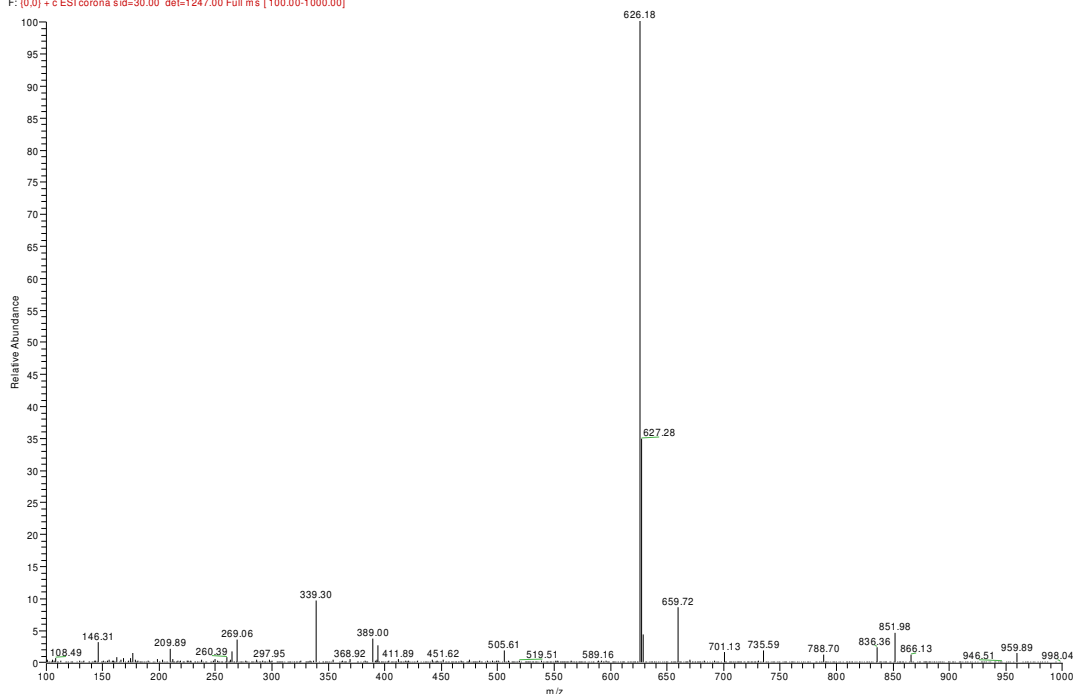


Fig. 17 Spettro LCMS multicarica del monomero finale di PNA con catena laterale di serina.

Il monomero sintetizzato sarà utilizzato per la sintesi in fase solida di nuovi oligomeri di PNA con proprietà di solubilità ed affinità di legame per il *target* incrementate. Gruppi ossidrilici, infatti, possono essere derivatizzati con unità solfato e/o fosfato al fine di introdurre unità cariche nello scheletro di PNA senza compromettere la stabilità di ibridi PNA/DNA, dal momento che puntano verso l'esterno del complesso. Inoltre, possono fungere da siti donatori/accettori di legami idrogeno; questa proprietà doterà gli acidi peptidico nucleici di nuove capacità di riconoscimento, poiché saranno in grado di interagire da un lato con la sequenza di DNA o RNA complementare e dall'altro di comportarsi da peptido-simili in grado di riconoscere proteine, aspetto, quest'ultimo, di fondamentale importanza nella strategia decoy.

3.2 Conclusioni

Obiettivi principali della seconda fase del lavoro di ricerca sono stati la progettazione, la sintesi e la caratterizzazione di due analoghi di PNA.

La natura non carica del PNA, se da un lato porta a numerosi vantaggi, dall'altro causa una serie di limiti quali scarsa solubilità in acqua, tendenza all'autoaggregazione, basso uptake cellulare ed, altresì, ridotta affinità nei confronti di proteine, abbassando enormemente le potenzialità di utilizzo di queste molecole in un approccio di tipo decoy, a meno che non ibridizzate o coniugate a filamenti di DNA. Di qui l'idea di progettare e sintetizzare nuovi monomeri di PNA opportunamente modificati in modo tale da non penalizzare le proprietà di ibridazione del PNA verso l'acido nucleico target. E' stata quindi messa a punto una strategia sintetica volta all'ottenimento di monomeri di PNA recanti catene laterali di tipo amminoisidico. Sono stati progettati, in particolare, due monomeri di PNA derivatizzati sulla posizione γ dello scheletro pseudopeptidico con un gruppo mercaptometile, in un caso, e con uno idrossimetile nell'altro, tali da mimare, rispettivamente, una cisteina ed una serina.

La scelta di una catena laterale di tipo cisteinico risiede nella spiccata versatilità del gruppo mercaptometile. Grazie, infatti, alla sua elevata nucleofilicità, può fungere da "braccio" per derivatizzazioni post-sintetiche: 1) può essere usato in reazioni di sostituzione nucleofila, anche in presenza della funzione amminica terminale libera, per l'introduzione di sonde in oligomeri di PNA; 2) un monomero di PNA con un motivo di tipo 1-ammino-2- mercaptometile, se posto all'N-terminale di una catena di PNA, può essere

utilizzato per ottenere coniugati PNA-peptide o PNA lunghi (una certa difficoltà, infatti, è stata riscontrata nella sintesi in fase solida di PNA più lunghi di 20 nucleobasi per la bassa resa finale di prodotto) in seguito alla reazione con un peptide o un PNA tioestere al C-terminale.

Altrettanto interessante si presenta il monomero di PNA con catena laterale idrossimetilica: gruppi OH, infatti, possono essere derivatizzati con unità solfato e/o fosfato al fine di introdurre unità cariche nello scheletro di PNA. Inoltre, possono fungere da siti donatori/accettori di legami idrogeno; questa proprietà è importante perché può conferire ai PNA nuove capacità di riconoscimento, dal momento che può permettere loro di interagire da un lato con la sequenza di DNA o RNA complementare e dall'altro di comportarsi da peptido-simili in grado di riconoscere proteine, aspetto, quest'ultimo, di fondamentale importanza nella strategia decoy.

La strategia messa a punto per la sintesi del monomero di PNA analogo della cisteina prevede la condensazione di uno scheletro di PNA modificato con una base eterociclica opportunamente derivatizzata. L'analisi retrosintetica dello scheletro modificato mostra come esso possa essere ottenuto dal cisteinolo, commercialmente disponibile, attraverso i seguenti passaggi: 1) protezione della funzione amminica terminale con il gruppo tert-butoxycarbonile (Boc) mediante reazione con Boc-anidride in presenza di TEA; 2) trasformazione del gruppo ossidrilico in azide mediante trattamento con $\text{PPh}_3/\text{NaN}_3$ in CCl_4/DMF ; 3) riduzione dell'azide ad ammina mediante idrogenazione catalitica su carbone palladiato; 4) reazione dell'ammina con metilbromoacetato in DCM. Le basi eterocicliche possono essere sintetizzate seguendo procedure riportate in letteratura. Per semplicità è stato sintetizzato un monomero avente per base eterociclica la timina, ma la procedura può essere utilizzata per ottenere monomeri con tutte le altre basi. Il monomero

presenta un centro chirale: la strategia non prevede reazioni che modificano il centro chirale.

Tutte le procedure sintetiche sino ad ora impiegate per la preparazione di monomeri di PNA con catena laterale di tipo cisteinico richiedono la formazione di un'aldeide come intermedio di reazione, la quale, avendo una forte tendenza a racemizzare, è difficile da maneggiare e conservare. La strategia sintetica da noi sviluppata supera il problema della racemizzazione e la necessità di operare in condizioni estremamente anidre, in quanto prevede la formazione di intermedi di reazione molto più stabili (azidi ed ammine).^{50,51}

Sfortunatamente, la stessa strategia applicata alla sintesi del monomero di PNA analogo della serina si è rivelata insoddisfacente. Per l'ottenimento del secondo monomero modificato si è ricorso, quindi, ad una strategia sintetica alternativa. La sintesi prevede la trasformazione della Boc/Bn serina nella cosiddetta "ammide di Weinreb" per reazione con la N,O-dimetilidrossilammina cloridrato. La successiva riduzione con idruro di litio e alluminio fornisce la corrispondente aldeide in buona resa. L'aldeide è poi sottoposta ad amminazione riduttiva con glicina metilestere per dare lo scheletro modificato. La condensazione di quest'ultimo con la base eterociclica derivatizzata fornisce il monomero protetto. L'idrolisi della funzione esterea con NaOH per liberare il gruppo carbossilico, la rimozione del Boc e successiva protezione con Fmoc del gruppo amminico forniscono il monomero desiderato.

La stereochimica L al carbonio γ è quella che garantisce la migliore disposizione spaziale della catena laterale all'interno di una duplex PNA/DNA, come dedotto da simulazioni di dinamica molecolare.

Tutti i prodotti sono stati caratterizzati mediante NMR (^1H e ^{13}C) e spettrometria di massa ESI.

3.3 Parte sperimentale

Materiali e metodi

I reattivi utilizzati per la sintesi dei due monomeri di PNA sono tutti della ditta Fluka.

La cromatografia su strato sottile (TLC) è stata eseguita su lastre analitiche di Gel di silice 60 F₂₅₄ della Merk (dimensioni 5x20 cm; spessore dello strato 0.25 cm) ed i prodotti sono stati visualizzati mediante luce UV a $\lambda = 254$ nm. Le cromatografie flash sono state effettuate utilizzando Silica gel 60 (size: 0.04-0.063 mm) della ditta Fluka.

Gli spettri ^1H e ^{13}C NMR sono stati registrati su uno spettrometro Varian Innova 400 MHz alla temperatura di 25°C; tutti i chemical shift sono espressi in ppm utilizzando come riferimento il segnale residuo del solvente.

Le analisi LC-MS sono state condotte con un sistema costituito da un HPLC della serie Surveyor, usando una colonna Phenomenex Jupiter 5 μ C18 300Å, (150x460 nm), comprendente una pompa quaternaria, un autocampionatore ed un rivelatore a fotodiodi (PDA) ed uno spettrometro di massa Thermo Finnigan equipaggiato con una sorgente elettrospray (modello MSQ).

3.3.1 Sintesi e caratterizzazione del monomero di PNA derivatizzato sulla posizione γ dello scheletro pseudopeptidico con il gruppo mercaptometile

N-TERZ-BUTOSSICARBONIL-S-BENZIL-(R)-CISTEINOLO (22)

505 mg di cisteinolo (2.56 mmol), sciolti in 7.50 ml di THF ed uniti a 359 μ l di TEA, vengono portati alla temperatura di 0°C. A tale soluzione si aggiungono 558 mg di Boc₂O (2.56 mmol). Dopo circa 10 minuti si riporta il tutto a temperatura ambiente e si lascia in agitazione per 2 ore. La reazione è completa, come dimostrato da TLC in etere di petrolio/acetato di etile 6/4 v/v. Si allontana il THF mediante evaporazione a pressione ridotta e si effettua un'estrazione con H₂O/acetato. La fase organica è recuperata, anidrificata su Na₂SO₄ anidro, filtrata e concentrata mediante evaporazione a pressione ridotta. Si recuperano 744 mg di prodotto.

R_f: 0.60 (etere di petrolio/acetato 6/4 v/v).

Resa: 98%.

Spettro di massa: m/z (ESI), [M+H]⁺ calcolato 298.14; trovato 298.12. ¹H NMR (CDCl₃): 1.45 (9H, s, CH₃Boc), 2.36 (1H, s, OH), 2.61 (2H, m, CH₂-S), 3.71- 3.80 (5H, m, CH₂-OH, Ph-CH₂, C α), 7.25-7.34 (5H, m, Ph). ¹³C NMR (CDCl₃): 28.85 (CH₃Boc), 33.09 (SCH₂), 37.04 (PhCH₂), 51.99 (C α), 64.73 (CH₂OH), 127.7, 129.08, 129.4, 138.5 (Ph).

N-TERZ-BUTOSSICARBONIL-2-AZIDO-1-(BENZILTOMETIL)-ETILAMMINA (23)

744 mg di N-terz-butossicarbonil-S-Benzil-cisteinolo (2.50 mmol), 198 mg di sodio azide (3.00 mmol) e 656 mg di trifenilfosfina (2.50 mmol) vengono disciolti in 28 mL di CCl₄/DMF 1/4 v/v e portati ad una temperatura di 90 °C sotto agitazione. Dopo due ore si osserva completa scomparsa del reattivo di

partenza. La reazione viene monitorata mediante TLC in etere di petrolio/acetato 7/3 v/v. Si effettua estrazione con H₂O/Et₂O. La fase organica è seccata su Na₂SO₄ anidro, filtrata e concentrata mediante evaporazione a pressione ridotta. Il residuo è purificato mediante cromatografia su colonna (etere di petrolio/acetato di etile 9/5 v/v). Si ottengono 579 mg di prodotto.

R_f: 0.52 (etere di petrolio/acetato 7/3 v/v).

Resa: 72%.

Spettro di massa: m/z (ESI), [M+H]⁺ calcolato 323.15; trovato 323.10. **¹H NMR (CDCl₃):** 1.45 (9H, s, CH₃Boc), 2.57 (2H, m, CH₂S), 3.47- 3.86 (5H, m, 5H, m, CH₂N₃, PhCH₂, Cα), 7.25-7.34 (5H, m, Ph). **¹³C NMR (CDCl₃):** 28.82 (CH₃Boc), 33.59 (SCH₂), 36.95 (PhCH₂), 49.76 (Cα), 53.51 (CH₂N₃), 127.7, 129.1, 129.4, 138.3 (Ph), 156.3 (C=O).

N-TERZ-BUTOSSICARBONIL-2-(BENZILTOMETIL)-ETILEN DIAMMINA (24)

1.00 g di **23** (3.11 mmol) vengono sciolti in 20 mL di CH₂Cl₂ e si aggiungono 100 mg di Pd/C come catalizzatore. Si fa gorgogliare N₂ per 5 minuti ed H₂ per circa 40 minuti. La reazione è completa come dimostrato dalla scomparsa su TLC in acetato/metanolo 8/2 v/v del prodotto di partenza. La soluzione è filtrata per allontanare il catalizzatore. Il prodotto è direttamente usato nello stadio successivo senza ulteriore purificazione.

R_f: 0.52 (acetato/metanolo 8/2 v/v).

Resa: 90%.

Spettro di massa: m/z (ESI), [M+H]⁺ calcolato 297.16; trovato 297.10. **¹H NMR (CDCl₃):** 1.45 (9H, s, CH₃Boc), 2.50-2.65 (2H, m, CH₂S), 2.80 (2H, bs, CH₂NH₂), 3.60-3.73 (3H, bs, CH₂Ph, Cα), 7.25-7.34 (5H, m, Ph). **¹³C NMR (CDCl₃):** 28.88 (CH₃Boc), 34.27 (SCH₂), 37.15 (PhCH₂), 44.71

(CH₂NH₂), 52.21 (C α), 80.01 (CBoc), 127.6, 129.0, 129.5, 138.6 (Ph), 156.2 (C=O).

**N-TERZ-BUTOSSICARBONIL-1-(BENZILTOMETIL)-N'-METOSI
CARBONILMETIL-ETILENDIAMMINA (25)**

900 mg di **24** (3.04 mmol) vengono sciolti in 10 mL di DCM anidro e si aggiungono 470 μ L di TEA (3.34 mmol). Alla soluzione si uniscono, goccia a goccia, 279 μ L di metilbromoacetato (3.04 mmol) diluiti in 200 μ L di DCM e si lascia in agitazione per tutta la notte. L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC in etere etilico/ etere di petrolio 7/3 v/v. Si effettua estrazione con NaHCO₃; si secca la fase organica su Na₂SO₄, si filtra e si concentra mediante evaporazione a pressione ridotta. Il residuo è purificato mediante cromatografia su colonna (etere etilico/etere di petrolio 6/4 v/v). Vengono recuperati 612 mg di prodotto puro.

R_f: 0.3 (etere etilico/etere di petrolio 85/5 v/v).

Resa: 55%.

Spettro di massa: m/z (ESI), [M+H]⁺ calcolato 369.18; trovato 369.10. **¹H NMR (CDCl₃):** 1.45 (9H, s, CH₃Boc), 2.52-2.78 (4H, m, CH₂S and CH₂N), 3.37 (2H, dd, NCH₂CO), 3.72 (3H, s, OCH₃), 3.73 (2H, s, CH₂Ph), 3.8 (1H, bs, C α), 7.25-7.34 (5H, m, Ph). **¹³C NMR (CDCl₃):** 28.88 (CH₃Boc), 34.66 (SCH₂), 37.26 (PhCH₂), 50.21 (CH₂NH), 51.27 (CH₂C=O), 51.86 (OCH₃), 52.27 (C α), 79.97 (CBoc), 127.5, 129.0, 129.5, 138.7 (Ph), 156.0 (NHC=O).

**N-TERZ-BUTOSSICARBONIL-1-(BENZILTOMETIL)-N'-METOSI
CARBONILMETIL-N'-[(TIMIN-1-IL)ACETIL]-ETILENDIAMMINA
(27)**

490 mg di **25** (1.33 mmol) vengono sciolti in 10.0 mL di DMF anidra con aggiunta di 355 mg di carbossimetiltimina **26** (1.93 mmol) e 15.9 mg di

DMAP (0.13 mmol). La sospensione è tenuta sotto agitazione per circa 10 minuti. Quindi, si aggiungono 561 mg di EDC (2.93 mmol). La soluzione è lasciata in agitazione per tutta la notte. L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC in etere etilico/ etere di petrolio 7/3 v/v. A reazione terminata, si allontana la DMF mediante sotto vuoto e si effettua un'estrazione con NaHCO₃/acetato di etile; si secca la fase organica su Na₂SO₄ anidro, si filtra e si concentra mediante evaporazione a pressione ridotta. Il residuo è purificato mediante cromatografia su colonna (acetato di etile/etere di petrolio 95/5 v/v). Vengono recuperati 670 mg di prodotto con una resa del 94%.

R_f: 0.55 (etere etilico/etere di petrolio 7/3 v/v).

[α]_D²⁰ = -7.4 (c = 0.02 in CHCl₃).

Spettro di massa: m/z (ESI), [M+H]⁺ calcolato 535.21; trovato 535.29. ¹H

NMR (CDCl₃): due rotameri; prodotto prioritario 1.41 (9H, s, CH₃Boc), 1.66 (1H, s, NH), 1.91 (3H, s, CH₃Thy), 2.48-2.78 (4H, m, CH₂S and CH₂N), 3.43-3.46 (2H, dd, NCH₂CO), 3.72 (3H, s, OCH₃), 3.76 (2H, s, N1ThyCH₂CO), 3.8 (2H, s, CH₂Ph), 4.12-4.16 (1H, m, Cα), 6.98 (1H, s, H6), 7.25-7.32 (5H, m, Ph), 8.35 (1H, s, NHThy). ¹³C **NMR (CDCl₃):** due rotameri; prodotto prioritario 12.81 (CH₃Thy), 28.81 (CH₃Boc), 37.41 (SCH₂), 41.61 (PhCH₂), 48.00 (CH₂COOMe), 49.42 (Cα), 51.08 (CH₂N1Thy), 52.83 (COOMe), 53.40 (CαCH₂N), 111.1 (C5Thy), 127.9, 129.2, 129.4, 138.5 (Ph), 151.3 (C(2)=OThy), 164.3 (C(4)=OThy), 169.9 (COOMe).

N-TERZ-BUTOSSICARBONIL-1-(BENZILTOMETIL)-N'-CARBOSSIMETIL-N'-[(TIMIN-1-IL)ACETIL]-ETILENDIAMMINA (28)

Si sciolgono 25.0 mg di **27** (46.8 μmol) in diossano (500 μL) e si aggiunge NaOH 2 M (117 μL). La miscela di reazione è tenuta sotto agitazione per circa 15 minuti. La reazione procede quantitativamente come rivelato da TLC. Si porta, dunque, a pH 2-3 mediante acidificazione con HCl 1N. Si estrae con acetato di etile, si riuniscono le fasi organiche, si secca su Na_2SO_4 anidro e si concentra mediante evaporazione a pressione ridotta. La purificazione di un campione analitico (9.7 mg) mediante HPLC a fase inversa fornisce il prodotto desiderato sotto forma di polvere bianca (8.2 mg).

R_f : 0.70 (acetato di etile/metanolo/acido formico 85/10/5 v/v/v).

Resa: 87 %.

Spettro di massa: m/z (ESI), $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcolato 521.21; trovato 521.27. **^1H NMR (CDCl_3):** due rotameri; prodotto prioritario 1.42 (9H, s, CH_3Boc), 1.88 (3H, s, CH_3Thy), 2.48-2.68 (4H, m, CH_2S and CH_2N), 3.48-4.58 (1H, m, $\text{C}\alpha$), 3.71 (2H, s, NCH_2CO), 3.75 (4H, s, CH_2Ph and $\text{N1ThyCH}_2\text{CO}$), 6.97 (1H, s, H6Thy), 7.23-7.32 (5H, m, Ph), 10.1 (1H, s, COOH). **^{13}C NMR (DMSO):** due rotameri; prodotto principale 15.85 (CH_3Thy), 32.22 (CH_3Boc), 37.98 (SCH_2), 38.70 (PhCH_2), 51.97, 52.43, 54.98, 81.98 (CBoc), 111.9 (C5Thy), 130.6, 132.2, 132.8, 142.6 (Ph), 146.1, 155.0, 159.3, 168.4 (COOH).

3.3.2 Sintesi e caratterizzazione del monomero di PNA derivatizzato sulla posizione γ dello scheletro pseudopeptidico con il gruppo idrossimetile

N-TERZ-BUTOSSICARBONIL-O-BENZILSERIN-WEINREB AMMIDE (30)

1.00 g di Boc/Bn serina (**29**) (3.39 mmol), 439 mg di N,O-(dimetil)-idrossilammina cloridrato (4.50 mmol) e 41,4 mg di DMAP (0.34 mmol) sono sciolti in 20 mL di DCM anidro e portati alla temperatura di 0°C. Si

aggiungono TEA (793.3 μ L) lentamente per 5 minuti ed EDC (779 mg; 4.06 mmol) e si lascia a 0°C per un'ora. La miscela viene poi portata a temperatura ambiente e lasciata sotto agitazione per 19 ore. Quindi, si estrae con HCl 1N, NaHCO₃ acq. al 10% ed infine con H₂O; si secca la fase organica su Na₂SO₄ anidro, si filtra e si concentra mediante evaporazione a pressione ridotta. Il prodotto pulito è ottenuto per cromatografia su gel di silice (etere etilico/etere di petrolio 6/4 v/v). Si recuperano 1,3 g.

R_f: 0.48 (etere etilico/etere di petrolio 6/4 v/v).

Resa: 98%.

Spettro di massa: m/z (ESI), [M+H]⁺ calcolato 338.1; trovato 338.2. **¹H NMR (CDCl₃)** 1.44 (9H, s, t-butyl-CH₃-), 3.21 (3H, s, -N-CH₃-), 3.63-3.68 (2H, m, -CH-CH₂-O-), 3.71 (3H, s, -O-CH₃-), 4.53 (2H, sistema AB, -O-CH₂-Ph), 4.88 (1H, br s, -NH-CH-C-), 5.42 (1H, br d, Boc-NH-), 7.29 (5H, m, -Ph-H). **¹³C NMR (CDCl₃)** 28.56 (t-butyl-CH₃-), 32.40 (-N-CH₃-), 51.06 (-NH-CH-C-), 61.67 (-O-CH₃-), 70.00 (-CH-CH₂-O-), 73.31 (-O-CH₂-Ph), 79.92 (t-butyl-C-), 127.85, 127.89, 128.57, 138.03 (-Ph), 155.65 (C=O).

N-TERZ-BUTOSSICARBONIL-O-BENZIL SERINALE (31)

Una soluzione di **30** (2.30 g; 6.78 mmol) in THF anidro (60.0 mL) viene raffreddata a 0°C sotto atmosfera di azoto. Quindi, si aggiunge cautamente idruro di litio e alluminio (500 mg; 13.6 mmol) e, dopo circa un'ora, si blocca la reazione con 30.0 mL di una soluzione di KHSO₄ 0.2 M. Si estrae con etere dietilico, quindi si secca la fase organica su Na₂SO₄, si filtra e si concentra mediante evaporazione a pressione ridotta. Si ottengono 1,8 g di prodotto, utilizzati nello step successivo senza ulteriore purificazione.

R_f: 0.8 (etere di petrolio/acetato 2/3 v/v).

Resa: 95%.

^1H NMR (CDCl_3) 1.46 (9H, s, t-butyl- CH_3 -), 3.69-3.73 (1H, m, -CH- CH_2 -O-), 3.98-4.01 (1H, m, -CH- CH_2 -O-), 4.32 (1H, br s, -NH- CH -C-), 4.51 (2H, dd, -O- CH_2 -Ph), 5.42 (1H, br d, Boc-NH-), 7.29 (5H, m, -Ph-H), 9.63 (H-C=O).
 ^{13}C NMR (CDCl_3) 28.75 (t-butyl- CH_3 -), 60.53 (-NH- CH -C-), 68.29 (-CH- CH_2 -O-), 74.02 (-O- CH_2 -Ph), 80.71 (t-butyl-C-), 128.15, 128.45, 128.98, 137.73 (-Ph), 156.07 (-O-CO-N-), 199.63 (H-C=O).

N-TERZ-BUTOSSICARBONIL-1-(O-BENZILOSSIMETIL)-AMMINO ETIL GLICINA METILESTERE (32)

Una soluzione di **31** (1.80 g; 6.45 mmol) in MeOH anidro (50.0 mL) viene raffreddata a 0°C sotto atmosfera di azoto. Separatamente, in un altro pallone, si scioglie il cloridrato della glicina metilestere (1.89 g; 13.6 mmol) in MeOH (5.00 mL) e DIPEA (2.36 mL; 13.6 mmol); tale soluzione viene poi aggiunta alla precedente e la risultante miscela di reazione viene lasciata in agitazione a 4°C per 4 ore. Successivamente, si aggiunge acido acetico (1.20 mL; 20 mmol), seguito da cianoboroidruro di sodio (620 mg; 10.0 mmol) e si lascia in agitazione per altri 30 minuti. Si aggiungono 100 mL di una soluzione di NaHCO_3 al 10% e si estrae con acetato di etile; la fase organica è poi lavata con H_2O e seccata su Na_2SO_4 anidro. Il solvente è rimosso mediante evaporazione a pressione ridotta ed il risultante residuo è purificato mediante cromatografia su gel di silice per dare 1,6 g di prodotto pulito.

R_f : 0.38 (esano/acetato 2/3 v/v).

Resa: 68%.

Spettro di massa: m/z (ESI), $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcolato 352.2; trovato 352.8. **^1H NMR (CDCl_3)** 1.42 (9H, s, t-butyl- CH_3 -), 2.02 (1H, s, - CH_2 -NH- CH_2 -), 2.72 (1H, dd, -CH- CH_2 -N-), 2.82 (1H, br dd, -CH- CH_2 -N-), 3.38 (2H, sistema AB, NH- CH_2 -C), 3.50 (1H, br s, -CH- CH_2 -O-), 3.57 (1H, br s, -CH- CH_2 -O-), 3.69

(3H, s, O-CH₃), 3.80 (1H, br s, -NH-CH-CH₂-), 4.49 (2H, s, -O-CH₂-Ph), 5.13 (1H, br s, Boc-NH-), 7.30 (5H, m, -Ph-H). ¹³C NMR (CDCl₃) 28.77 (t-butyl-CH₃-), 50.27 (-CH-CH₂-N-), 50.78 (-NH-CH₂-CO-), 51.17 (-O-CH₃), 52.08 (-NH-CH-CH₂-), 70.83 (-CH-CH₂-O-), 73.62 (-O-CH₂-Ph), 79.61 (t-butyl-C), 127.98, 128.05, 128.77, 138.46 (-Ph), 156.05 (-O-CO-N-), 173.25 (-COOCH₃).

Boc-(BzlOCH₂)-T-OMe (33)

500 mg di **4** (1.42 mmol) vengono sciolti in 8.00 mL di DMF anidra con aggiunta di 366 mg di carbossimetiltimina (1.99 mmol) e 599 mg di EDC (3.12 mmol). La soluzione è lasciata in agitazione per tutta la notte. L'andamento della reazione è monitorato mediante TLC in acetato di etile/etere di petrolio 9/1 v/v. Si allontana la DMF mediante evaporazione a pressione ridotta e si estrae con CHCl₃ ed H₂O. La fase organica è seccata su Na₂SO₄ anidro e poi concentrata mediante evaporazione a pressione ridotta. Il prodotto pulito è ottenuto per purificazione mediante cromatografia. Si recuperano 590 mg di polvere gialla con una resa dell'84%.

R_f: 0.50 (acetato di etile/etere di petrolio 9/1 v/v).

Spettro di massa: m/z (ESI), [M+H]⁺ calcolato 518.3; trovato 518.2. ¹H NMR (CDCl₃) 2 rotameri in soluzione: 1.43 (9H, s, t-butyl-CH₃-), 1.87 & 1.90 (3H, s, CH₃ timina), 3.44-3.62 (2H, m, -CH-CH₂-O-), 3.69 (3H, s, -OCH₃), 3.77 (1H, m, -NH-CH-CH₂-), 3.94 & 3.98 (2H, s, -CO-CH₂-timina), 4.16-4.25 (2H, m, -CH-CH₂-N-), 4.40-4.70 (2H, m, -O-CH₂-Ph), 4.57 & 4.58 (2H, s, -N-CH₂-CO), 5.24 & 5.38 (1H, br d, BocNH), 6.90 & 7.03 (1H, s, H(6)-timina), 7.32 (5H, m, -Ph-H), 8.10 (1H, s, NH-timina). ¹³C NMR (CDCl₃) 12.52 (CH₃-timina), 28.54 (t-butyl-CH₃), 47.88 (N-CH₂-CO), 48.00 (CH-CH₂-N-), 48.98 (NH-CH-CH₂-), 49.36 (-CO-CH₂-timina), 52.46 (-O-CH₃), 68.29 (-CH-CH₂-O-), 73.61 (-O-CH₂-Ph), 80.01 (t-butyl-C), 110.89

(C(5)-timina), 127.96, 128.26, 128.61, 128.76, 137.98 (-Ph), 141.52 (C(6)-timina), 151.50 (C(2)-timina), 155.82 (t-butyl-O-CO), 164.78 (C(4)-timina), 167.92 (-CO-CH₂-timina), 170.01 (COOCH₃).

Boc-(BzlOCH₂)-T-OH (34)

56.0 mg di **33** (0.11 mmol) sono sciolti in diossano (1.50 mL) e trattati con una soluzione di NaOH 2M (270 µL). La miscela è lasciata in agitazione per 20 minuti, quindi si porta a pH ≈ 2 con HCl 1N e si estrae con acetato di etile. La fase organica è lavata un paio di volte con H₂O e poi seccata su Na₂SO₄ anidro. Si filtra, si allontana il solvente mediante evaporazione a pressione ridotta e si secca il risultante olio sotto vuoto. Si recuperano 55 mg di prodotto.

R_f: 0.48 (cloroformio/metanolo/acqua 14/6/1 v/v/v).

Resa: 100%.

Spettro di massa: m/z (ESI), [M+H]⁺ calcolato 504.3; trovato 504.2. **¹H NMR (CDCl₃)** 2 rotameri in soluzione: 1.64 (9H, s, t-butyl-CH₃-), 2.05 & 2.06 (3H, s, CH₃ timina), 3.51-3.68 (2H, m, -CH-CH₂-O-), 3.74 (1H, m, -NH-CH-CH₂-), 3.85 (2H, s, -CO-CH₂-timina), 4.21-4.50 (2H, m, -CH-CH₂-N-), 4.70-4.78 (2H, m, -O-CH₂-Ph), 4.95 (2H, dd, -N-CH₂-CO), 5.10 (1H, br s, BocNH), 7.41 & 7.44 (1H, s, H(6)-timina), 7.46-7.56 (5H, m, -Ph-H), 8.10 (1H, s, NH-timina). **¹³C NMR (CD₃OD)** 12.55 (CH₃-timina), 29.02 (t-butyl-CH₃), 48.66 (N-CH₂-CO), 49.65 (CH-CH₂-N-), 49.79 (NH-CH-CH₂-), 49.94 (-CO-CH₂-timina), 68.38 (-CH-CH₂-O-), 74.52 (-O-CH₂-Ph), 80.82 (t-butyl-C), 111.15 (C(5)-timina), 128.98, 129.14, 129.66, 129.76, 139.74 (-Ph), 143.90 (C(6)-timina), 153.20 (C(2)-timina), 158.10 (t-butyl-O-CO), 167.23 (C(4)-timina), 170.50 (-CO-CH₂-timina), 172.53 (COOH).

NH₂-(BzlOCH₂)-T-OH (35)

Si sciolgono 46.6 mg di **34** (0.09 mmol) in 1.00 mL di TFA/CH₂Cl₂/TIS 47/50/3 e si lascia in agitazione per 10 minuti. Quindi, si allontana il TFA mediante insufflazione di azoto e si precipita in etere freddo. Il precipitato viene risospeso in H₂O, purificato mediante HPLC preparativo e liofilizzato. Si recuperano 37 mg di prodotto pulito.

R_f: 0.48 (cloroformio/metanolo/acqua 14/6/1 v/v/v).

Resa: 100%.

Spettro di massa: m/z (ESI), [M+H]⁺ calcolato 404.3; trovato 404.2. **¹H NMR (DMSO)** 2 rotameri in soluzione: 1.85 & 1.86 (3H, s, CH₃ timina), 4.10 (2H, s, -CO-CH₂-timina), 4.34 (2H, s, -N-CH₂-COOH), 4.63 (2H, s, -O-CH₂-Ph), 7.37 & 7.41 (1H, s, H(6)-timina), 7.47 (5H, m, -Ph-H), 11.41 & 11.45 (1H, s, COOH). I picchi per -NH-CH-CH₂-, -CH-CH₂-N- e -CH-CH₂-O- sono coperti dal segnale dell'acqua contenuta nel DMSO nell'intervallo 3.2-3.7. **¹³C NMR (DMSO)** 15.93 (CH₃-timina), 50.41 (N-CH₂-COOH), 51.78 (CH-CH₂-N-), 52.6 (NH-CH-CH₂-), 52.91 (-CO-CH₂-timina), 71.61 (-CH-CH₂-O-), 76.50 (-O-CH₂-Ph), 112.18 (C(5)-timina), 131.70-132.33 (-Ph), 141.52 (C(6)-timina), 155.00 (C(2)-timina), 168.31 (C(4)-timina), 172.97 (-CO-CH₂-timina), 174.66 (COOH).

FmocNH-(BzlOCH₂)-T-OH (36)

Si sciolgono 46.4 mg di **35** (0.11 mmol) in THF, si aggiunge K₂CO₃ al 20% acq. (71.5 µL) e si lascia in agitazione a 0°C. Quindi, si aggiunge Fmoc-OSu (36.3 mg; 0.11 mmol) e si lascia in agitazione per un'ora a temperatura ambiente. La miscela di reazione viene concentrata e si estrae con acetato di etile. La fase organica è lavata un paio di volte con H₂O e poi seccata su

Na₂SO₄ anidro. Si filtra e si allontana il solvente mediante evaporazione a pressione ridotta. Il prodotto finale è ottenuto per cromatografia su gel di silice.

R_f: 0.58 (acetato di etile/metanolo/acido formico 95/3/2 v/v/v).

Resa: 84%.

Spettro di massa: m/z (ESI), [M+H]⁺ calcolato 627.1; trovato 627.2. **¹H NMR (CDCl₃)** 2 rotameri in soluzione: 1.76 (3H, s, CH₃ timina), 3.46-3.70 (2H, m, -CH-CH₂-O-), 3.99-4.05 (1H, m, -NH-CH-CH₂-), 4.17-4.11 (2H, m, -CO-CH₂-timina), 4.25-4.27 ((2H, m, -CH-CH₂-N-), 4.36 (2H, br s, -O-CH₂-Ph), 4.44 (1H, br s, CH-Fmoc), 4.51 (2H, s, -N-CH₂-COOH), 4.60 (2H, br s, CH₂-Fmoc), 6.80 & 6.98 (1H, s, H(6)-timina), 7.19-7.34 (5H, m, OCH₂Ph), 7.46-7.92 (8H, m, fluorenil), 10.19 (1H, br s, COOH). **¹³C NMR (CDCl₃)** 11.98 (CH₃-timina), 47.04 (CH-Fmoc), 48.71 (-CH-CH₂-N-), 48.91 (CH-CH₂-N-), 49.60 ((N-CH₂-COOH), 49.89 (-CO-CH₂-timina), 67.04 (CH₂-Fmoc), 69.99 (-CH-CH₂-O-), 73.26 (-O-CH₂-Ph), 111.04 (C(5)-timina), 125.01, 127.09, 127.76, 127.97, 128.08, 128.41, 128.58, 137.62 (Ph), 137.30 (C(6)-timina), 141.22, 143.67 (C quaternari fluorenil), 151.65 (C(2)-timina), 156.48 (CO-Fmoc), 165.02 (C(4)-timina), 168.68 (-CO-CH₂-timina), 173.06 (COOH).

3.4 Bibliografia

1. Christensen, L.; Hansen, H.F.; Koch, T.; Nielsen, P.E. *Nucleic Acids Res*, **1998**, 26, 2735-2739.
2. Lohse, J.; Dahl, O.; Nielsen, P.E. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1999**, 96, 11804-11808.
3. Ferrer, E.; Shevchenko, A.; Eritja, R. *Bioorg Med Chem*, **2000**, 8, 291-297.
4. a) Gangamani, B.P.; Kumar, V.A.; Ganesh, K.N. *Chemical Communications*, **1997**, 1913-1914. b) De La Torre, B.G.; Eritja, R. *Bioorg Med Chem Lett*, **2003**, 13, 391-393.
5. Koheler, O.; Seitz, O. *Chem Commun*, **2003**, 23, 2938-2939.
6. Hyrup, B.; Egholm, M.; Buchardt, O.; Nielsen, P.E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1996, 6, 1083-1088.
7. Schutz, R.; Cantin, M.; Roberts, C. *Angew Chem Int Ed Engl*, **2000**, 39, 1250-1253.
8. Hollenstein, M.; Leumann, C.J. *J Org Chem*, **2005**, 70, 3205-3217.
9. Dueholm, K.L.; Petersen, K.H.; Jensen, D.K.; Egholm, M.; Nielsen, P.E.; Buchardt, O. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1994**, 4, 1077-1080.
10. Haaima, G.; Lohse, A.; Buchardt, O.; Nielsen, P.E. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1996**, 35, 1939-1942.
11. Haaima, G.; Lohse, A.; Buchardt, O.; Nielsen, P.E. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1996**, 35, 1939-1942.

- 12.Menchise, V.; De Simone, G.; Tedeschi, T. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2003**, 100, 12021-12026.
- 13.Tedeschi, T.; Chiari, M.; Galaverna, G. *Electrophoresis*, **2005**, **26**, 4310-4316.
- 14.Hyrup, B.; Egholm, M.; Rolland, M.; Nielsen, P.E.; Berg, R.H.; Buchardt, O. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1993**, 518-519.
- 15.Hyrup, B.; Egholm, M.; Nielsen, P.E.; Wittung, P.; Nordèn, B.; Buchardt, O. *J. Am. Chem.*, **1994**, 116, 7964-7960.
- 16.a) Krotz, A.H.; Buchardt, O.; Nielsen, P.E. *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 6937-6940. b) Krotz, A.H.; Buchardt, O.; Nielsen, P.E. *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 6941-6944. c) Nielsen, P.E.; Haaima, G. *Chem. Soc. Rev.*, **1997**, 73-75.
- 17.Van Der Laan, A.C.; Stromberg, R.; Van Boom, J.H. *Tetrahedron Letters*, **1996**, 37, 7857-7860.
- 18.Peyman, A.; Uhlmann, E.; Wagner, K. *Angewandte Chemie, International Edition in English*, **1996**, 35, 2636-2638.
- 19.Peyman, A.; Uhlmann, E.; Wagner, K. *Angewandte Chemie*, 1997, 36, 2809-2812.
- 20.Peyman, A.; Uhlmann, E.; Wagner, K. *Angewandte Chemie, Nucleosides & Nucleotides*, **1998**, 17, 1997-2001.
- 21.Efimov, V.A.; Choob, M.V.; Kalinkina, A.L. *Collect Czech Chem Commun*, **1996**, 61, S262-S264.
- 22.Myers, M.C.; Pokorski, J.K.; Appella, D.H. *Org Lett*, **2004**, 6, 4699-4702.
- 23.Kumar, V.A. *European Journal of Organic Chemistry*, **2002**, 13, 2021-2032.
- 24.Pokorski, J.K.; Myers, M.C.; Appella, D.H. *Tetrahedron Letters*, **2005**, 46, 915-917.

25. Gangamani, B.P.; Decosta, M.; Kumar, V.A.; Ganesh, K.N. *Nucleosides & Nucleotides*, **1999**, 18, 1409-1411.
26. Govindarayu, T.; Kumar, V.A.; Ganesh, K.N. *Chem Commun (Camb)* **2004**, 7, 860-861.
27. Puschl, A.; Sforza, S.; Haaima, G.; Dahl, O.; Nielsen, P.E. *Tetrahedron Letters*, **1998**, 39, 4707-4710.
28. Vilaivan, T.; Suparpprom, C.; Duanglaor, P. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 44, 1663-1666.
29. Suprapprom, C.; Srisuwannaket, C.; Sangvanich, P.; Vilaivan, T. *Tetrahedron Lett.*, **2005**, 46, 2833-2837.
30. Hamzavi, R.; Dolle, F.; Tavitian, B.; Dahl, O.; Nielsen, P.E. *Bioconjug. Chem.*, **2003**, 14, 941-954.
31. Englund, E.A.; Appella, D.H. *Org Lett*, **2005**, 7, 3465-3467.
32. Dose, C.; Seitz, O. *Org Lett*, **2005**, 7, 4365-4368.
33. Englund, E.A.; Appella, D.H. *Angewandte Chemie*, **2007**, 46, 1414-1418.
34. Dose, C.; Seitz, O. *Org Lett*, **2005**, 7, 4365-4368.
35. Mayfield, L.D.; Corey, D.R. *Anal. Biochem.*, **1999**, 268, 401.
36. Dawson, P.E.; Muir, T.W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S.B.H. *Science*, **1994**, 266, 776.
37. Caputo, R.; Cassano, E.; Longobardo, L.; Palumbo, G. *Tetrahedron*, **1995**, 51, 12337.
38. Reddy, G. V. S.; Rao, G. V.; Subramanyam, R. V. K.; Iyengar, D. S. *Synthetic Communications*, **2000**, 30, 2233.
39. Will, D.W.; Breipohl, G.; Langner, D.; Knolle, J.; Uhlmann, E. *Tetrahedron*, **1995**, 51, 12069-12082.
40. Hosoya, T.; Takeuchi, H.; Kanesaka, Y. *FEBS Lett.*, **1999**, 461, 136-140.

- 41.Lim, C.S.; Jabrane-Ferrat, N.; Fontes, J.D. *Nucleic Acids Res.*, **1997**, 25, 575-580.
- 42.Kozlov, I.A.; Kubareva, E.A.; Ivanovskya, M.G. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **1997**, 7, 279-289.
- 43.Uhlman, E.; Peyman, A. *Chem. Rev.*, **1990**, 90, 543-549.
- 44.Mischiati, C.; Borgatti, M.; Bianchi, N. *Journal of Biological Chemistry*, **1999**, 274, 33114-33122.
- 45.Saviano, M.; Romanelli, A.; Bucci, E. *Journal of Biomolecular Structure&Dynamics*, **2000**, 18, 353-362.
- 46.Romanelli, A.; Pedone, C.; Saviano, M. *Eur. J. Biochem.*, **2001**, 268, 6066-6075.
- 47.Borgatti, M.; Lampronti, I.; Romanelli, A. *J. of Biological Chemistry*, **2003**, 278, 7500-7509.
- 48.Will, D.W.; Breipohl, G.; Langner, D.; Knolle, J.; Uhlmann, E. *Tetrahedron*, **1995**, 51, 12069-12082.
- 49.Dragulescu-Andrasi, A; Rapireddy, S.; Frezza, B.M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 12, 11034-11041.
- 50.Jurczak, J.; Golebiowski, A. *Chemical Reviews*, **1989**, 89, 149.
- 51.Falkiewicz, B.; Kolodziejczyk, A. S.; Liberek, B.; Wisniewski, K. *Tetrahedron* **2001**, 57, 7909.

SUMMARY

The function of a gene starts by transcription of its information to a messenger RNA (mRNA). By interacting with the ribosomal complex, mRNA directs synthesis of the protein. This protein synthesis process is known as translation. Translation requires the presence of various cofactors, building blocks, amino acids and transfer RNAs (tRNAs), all of which are present in normal cells.

Most conventional drugs exert their effect by interacting with and modulating one or more targeted endogenous proteins, e.g., enzymes. Typically, however, such drugs are not specific for targeted proteins but interact with other proteins as well. Thus, the use of a relatively large dose of drug is necessary to effectively modulate the action of a particular protein. If the modulation of a protein activity could be achieved by the site-specific interaction of a drug with mRNA or by mRNA inactivation (antisense approach), the amount of drug necessary and the side-effects of the drug would be reduced. Oligonucleotides (ONs) have been developed and used for these purposes. However, natural ONs are susceptible to degradation by endo- and exonucleases. With the aim to improve resistance to nucleases, several studies have been devoted to the obtainement of modified ONs. Methyl phosphonates, phosphorothioates, phosphorodithioates and 2'-O-methyl are

representative examples of modified ON. Other oligonucleotide modifications include those made to modulate uptake and cellular distribution. Phosphorothioate oligonucleotides are presently used as antisense agents in human clinical trials for the treatment of various diseases. Although some improvements in diagnostic and therapeutic uses have been realized with these oligonucleotide modifications, there exists an ongoing demand for improved oligonucleotide analogs.

There are several known nucleic acid analogs having the ability to bind to complementary nucleic acids. Among these, the peptide nucleic acids (PNAs) show a great potential as therapeutic and diagnostic reagents, due to their higher affinity and specificity for complementary nucleobase sequences and to their higher resistance to enzymatic degradation than the corresponding natural nucleic acids. PNAs are compounds that are analogous to oligonucleotides, but differ in composition. In PNAs, the deoxyribose backbone of oligonucleotide is replaced by a peptide backbone. Each subunit of the peptide backbone, which is constituted by repeating units of N-(2-aminoethyl)glycine, is attached to a nucleobase through a methylene carbonyl linker. PNAs bind to both DNA and RNA and form PNA/DNA or PNA/RNA duplexes. The resulting PNA/DNA or PNA/RNA duplexes are more stable than the corresponding DNA/DNA or DNA/RNA duplexes, as evidenced by their higher melting temperatures (T_m). This high thermal stability of PNA/DNA(RNA) duplexes has been attributed to the neutrality of the PNA backbone, which results in the elimination of the charge repulsion that is present in DNA/DNA or RNA/RNA duplexes. Homopyrimidine PNAs have also been shown to bind complementary DNA or RNA forming (PNA)₂/DNA(RNA) triplexes of high thermal stability. In addition to increased affinity, PNAs have increased specificity for DNA binding. Thus, a PNA/DNA duplex mismatch causes a 8 to 20°C drop in the T_m relative to the

DNA/DNA duplex. Such decrease in T_m is not observed with the corresponding DNA/DNA duplex mismatch. Furthermore PNAs are able to strand invade DNA duplexes to give triplex or higher order complexes. These properties make PNAs powerful tools for interfering in gene expression as antigene and antisense molecules and in general in all applications based on the hybridization of PNA to DNA/RNA.

The synthesis, characterization and evaluation of PNAs as modulators of gene expression (splicing correction and antisense inhibition) is one of the topics of this work.

Most protein-encoding RNAs have to be processed by RNA splicing to generate fully functional messenger RNAs. Aberrant splicing processes result in new mRNA sequence which codify for non-functional proteins. This discovery engendered the concept of RNA repair for therapeutic applications. The basic idea is to design antisense oligonucleotides to correct the splice and generate the right gene product. We have investigated this approach in the context of the genetic blood disorder β -thalassemia. In β^{110} -thalassemia an A→G mutation at nucleotide (nt) 110 of the first intron of the human β -globin gene creates an additional, aberrant 3' splice site. In spite of the presence of the normal 3' splice site, the aberrant site is preferentially used by the splicing machinery, resulting in an incorrectly spliced mRNA. The aberrant 3' splice site appears, thus, to be an obvious target for reversal of aberrant splicing by an antisense oligonucleotide. Blocking this sequence element should be the simplest way of forcing the splicing machinery to use the original 3' splice site. To test this idea, a 14-mer PNA (nt 104-117) (PNA110) was targeted against the aberrant 3' splice site. Furthermore, the 14-mer PNA was conjugated to the ISV40 NLS peptide (PNA110/NLS) to enhance the PNA concentration in cells.

PNA110 H- AATAGACTAATAGG -NH₂

PNA110/NLS H- AATAGACTAATAGG- KPKKKRKV -NH₂

The ability of PNA110 and PNA110/NLS to hybridize with target DNA sequences was assayed by Surface Plasmon Resonance, using the Biacore biosensor. The results obtained indicated that both PNA110 and PNA110/NLS hybridize efficiently with target DNA sequences. The ability of the molecules to repair the splicing sites was determined by in vitro experiments on HeLa Cell Nuclear Extract carrying normal or mutated β -globin genes. The results obtained demonstrated that the splicing of both mutated and wild-type transcripts was inhibited by PNA110 and PNA110/NLS.

The lack of success may result from the proximity of the aberrant and correct 3' splice sites and, in consequence, the concomitant interference of PNA with both splicing pathways.

It was found that in β^{110} pre-mRNA mutations inactivating the normal branch point at nt 93 of the intron 1, activate a cryptic branch point at nt 107 and result in splicing at the correct 3' splice site. Aberrant splicing cannot proceed due to the proximity of the 3' splice site at position 111 to the cryptic branch point. We therefore reasoned that a PNA complementary to the normal branch point sequence will, as mutations do, block its function in splicing and force the splicing machinery to select the cryptic branch point, generating correctly spliced mRNA. To test this idea, a new 14-mer PNA (PNA110bis) was targeted against the branch point sequence in intron 1 of β -globin pre-mRNA. The branch point nucleotide is located at position 94 and the PNA spans positions 82-95. In order to improve the cellular uptake, the PNA was conjugated to ISV40 NLS peptide (PNA110bis/NLS).

PNA110bis H- GTCAGTGCCTATCA -NH₂

PNA110bis/NLS H- GTCAGTGCCTATCA- KPKKKRKV -NH₂

The ability of the new PNA-based molecules (PNA110bis and PNA110bis/NLS) to restore the correct splicing in intron 1 of the β -globin gene will be evaluated *in vitro* by using the same experiments carried out with PNA oligomers initially synthesized.

A further aim of this project was the design and synthesis of antisense PNA in order to specifically antagonize TrkAIII and not TrkAI pathway and consequently inhibit neuroblastoma (NB) growth and progression, as a proof of principle of target-specific therapy devoid of the adverse toxic effect associated to the traditional (chemotherapy and radiotherapy) treatments.

Neuroblastoma is the most common solid tumor of childhood. Although associated with a number of non-coding polymorphisms and point mutations within the TrkA gene, NB has not been so far associated with oncogenic TrkA activation. Despite current concepts that TrkA does not exhibit oncogenic properties in NB, it has been recently identified a novel hypoxia-regulated mechanism for oncogenic TrkA activation in human NB cells. This mechanism is characterised by the generation of a novel constitutively active TrkA splice variant, namely TrkAIII, at the expense of the physiologic TrkAI isoform. TrkAIII is expressed by primary human NBs and exhibits a number of putative oncogenic functions in NB cells and, furthermore, antagonizes NGF/TrkAI signalling, which instead induces NB cell differentiation and growth arrest. Therefore, TrkAIII may represent a putative target for therapeutical interventions. TrkAIII lacks exon 6, 7 e 9; therefore, in contrast with correctly spliced TrkAI and TrkAII isoforms, it possesses a novel unique exon 5-8 splice junction. Thus, a PNA-based molecule (TrkAIII-PNA) targeted against the 5-8 splice junction appears to be the simplest and the most powerful way of specifically binding TrkAIII and inhibiting its function. In order to enhance the PNA concentration in cells,

two PNA-peptide conjugates were also synthesized (TrKAIII-PNA/NLS and TrKAIII-PNA/ D(AAKK)₄).

TrKAIII-PNA	H- GGCCGGGACACA -NH ₂
TrKAIII-PNA /NLS	H- GGCCGGGACACA-KPKKKRKV -NH ₂
TrKAIII-PNA /D(AAKK)₄	H- GGCCGGGACACA-(AAKK) ₄ - NH ₂

Peptide D(AAKK)₄ contains all D-amino acids, introduced in order to improve the stability of the peptide, making it resistant to degradative enzymes.

The ability of molecules to specifically antagonize TrKAIII and not TrKAII pathway was evaluated through RT-PCR, Western blots and MTS assays.

The results obtained clearly demonstrated that PNAs synthesized are highly specific to exclusively inhibit the oncogenic isoform TrKAIII, but not TrKAII, as expected. The next logical step in this approach will be to demonstrate that these molecules can efficiently bind TrKAIII and inhibit its function *in vivo*.

All PNAs were synthesized on solid phase on a PAL-PEG resin, using standard protocols for the Fmoc(Bhoc) PNA synthesis. The PNA-peptide conjugates were obtained growing the PNA chain on a support with the NLS or the D(AAKK)₄ peptide anchored on. PNAs and PNA-peptide conjugates were purified by RP-HPLC and characterized by MALDI ToF mass spectrometry or electrospray.

The second part of this thesis is focused on the design and synthesis of two PNA analogues.

Although PNA meets several important requirements needed to function as an antisense/antigene drug, it has some crucial disadvantages that limit its use for therapeutic applications. Most importantly, PNA does not penetrate the cell membrane readily. Secondly, since RNase H does not recognize PNA/RNA complexes, PNA can only act as a sterical blocker,

which limits the number of target sites. Furthermore, PNA is susceptible to self-aggregation leading to low solubility in physiological environments. Finally, the lack of charge and hydrogen bond donors/acceptor in the PNA backbone inhibit their use in applications involving the recognition of molecules mediated by hydrogen bonds formation and charge-charge interactions. In order to solve these shortcomings, several PNA analogues have been synthesised over the years. However, many PNA backbone modifications have shown a deleterious effect on PNA hybridization.

Rational design and minimization studies showed that the derivatization of the γ -position of the PNA backbone with a 1-amino-2-hydroxymethyl moiety is not detrimental to complementary DNA binding. Based on these results, we focused on the synthesis of two PNA monomers bearing amino acids side chains, as those derived from serine and cysteine (fig. 1).

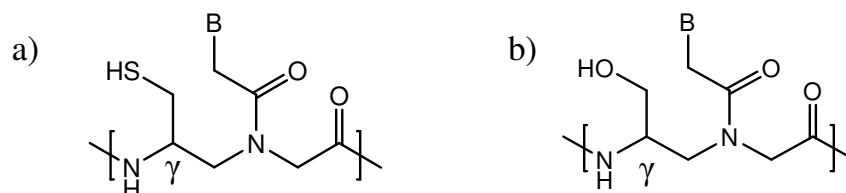
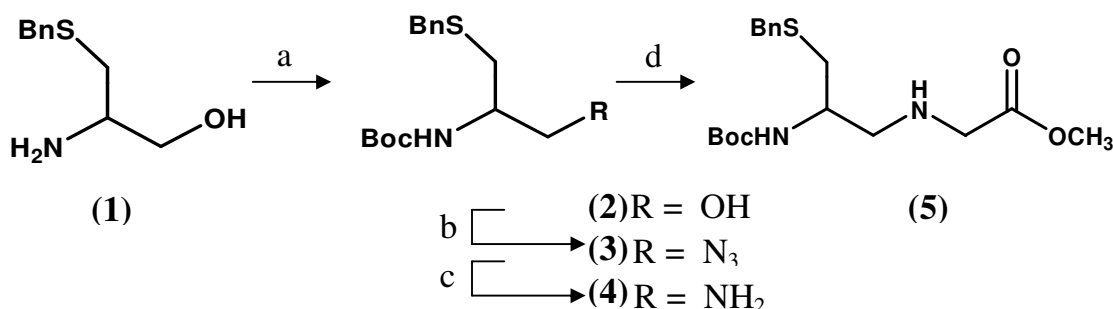


Fig. 1 Chemical structure of a) *L*-cysteine and b) *L*-serine derived γ PNA (*^LCys- γ PNA* and *^LSer- γ PNA*).

A cysteine-like PNA monomer at the N-terminus of a chain can be used for chemical ligation purposes, for obtaining either long PNA or PNA-peptide conjugates. Second, the presence of Cys-like residues in complementary strands might allow for the stabilization of duplex structures by disulfide bond formation. Furthermore, the nucleophilic SH group allows for the selective labelling of unprotected molecules; thus, it can be used for the introduction of a fluorophore into a PNA oligomer.

We developed a straightforward and stereoselective strategy for the synthesis of the γ -mercaptomethyl PNA monomer. Synthesis started out from commercially available S-benzyl cysteinol (**1**). After protection of the terminal amino group with Boc, the alcohol (**2**) was transformed into the corresponding azide derivative (**3**) by treatment with $\text{PPh}_3/\text{NaN}_3$ in CCl_4/DMF (Scheme 1).

Scheme 1

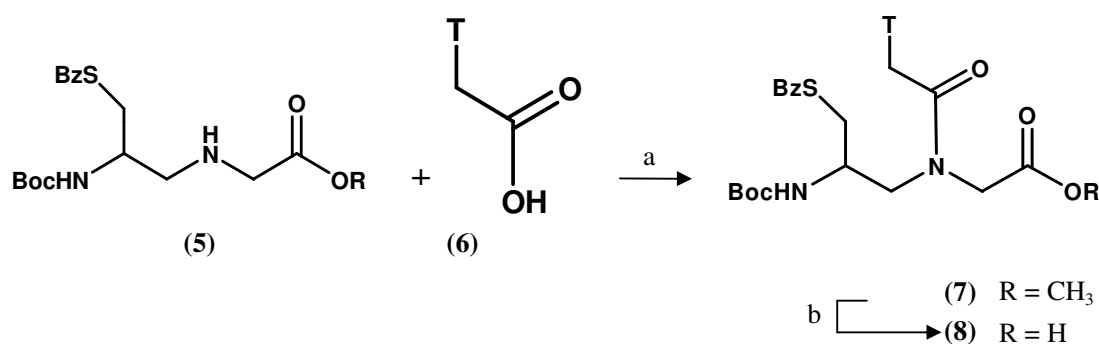


Reagents and conditions: a) Boc_2O , TEA, 98%; b) PPh_3 , NaN_3 , CCl_4/DMF 72%;

This reaction is usually employed for the synthesis of azides and amines from alcohols. Reaction proceeds through an intermediate chloride derivative, which is easily transformed into the azide, thanks to the high nucleophilicity of the azide group. Triphenylphosphine is used both for the halogenation reaction, and for the reduction of the azide. Attempts to obtain the amine from the alcohol, using either large amounts of phosphines or several phosphine derivatives were not successful. Reduction of the azide (**3**) was carried out by hydrogenation on palladiumated charcoal. The resulting amine (**4**) was then reacted with methyl bromoacetate to give the fully protected backbone (**5**) (Scheme 1). The new backbone was coupled to a functionalized nucleobase, synthesized following procedures reported in the literature (Scheme 2).

Reaction of **(5)** with 1N-carboxymethylthymine **(6)** afforded in high yield the mercaptomethyl derivatized PNA monomer **(7)**. The same reaction can be carried out with all the DNA bases, functionalized with a carboxymethylene. Deprotection of the ester **(7)** by treatment with sodium hydroxide afforded the carboxylic acid **(8)** (scheme 2), which can be used for the solid phase synthesis of modified PNA oligomers.

Scheme 2



Reagents and conditions: a) EDC, DMAP, 97%; b) NaOH 2M, 87%.

The main advantage of this strategy is represented by the use of more stable intermediates (azides and amines) as compared to those used in the protocols reported so far. Today all the synthetic procedures for the obtainment of Cys-modified PNA monomers involve the formation of an aldehyde intermediate, which cannot be purified nor stored as it easily racemizes. The present protocol overcomes the racemization issue and the need to operate in extremely dry conditions (as required for the N-protected α amino aldehydes synthesis).

The introduction of a hydroxymethyl group in a PNA chain is also challenging. In fact, OH groups may have a beneficial effect on PNA binding

properties with nucleic acids and on its water solubility. In our opinion, such a modified PNA monomer is of particular interest, thanks to the ability of the hydroxyl group to form hydrogen bonds, in approaches as the decoy, in which a protein-DNA interaction has to be disrupted. It was in fact demonstrated that PNA oligomers are not able to give stable interactions with transcription factors, because of the lack of hydrogen bonds donors/acceptor on the PNA backbone, their lack of charge and the difference in the structure between PNA and DNA duplex. Ser-based PNA oligomers possess features which potentially make them able to interact with transcription factors. Molecular dynamic simulations were performed on the complex between the transcription factor NF-kB and a PNA/DNA duplex containing two consecutive ^LSer- γ PNA monomers (fig. 2).

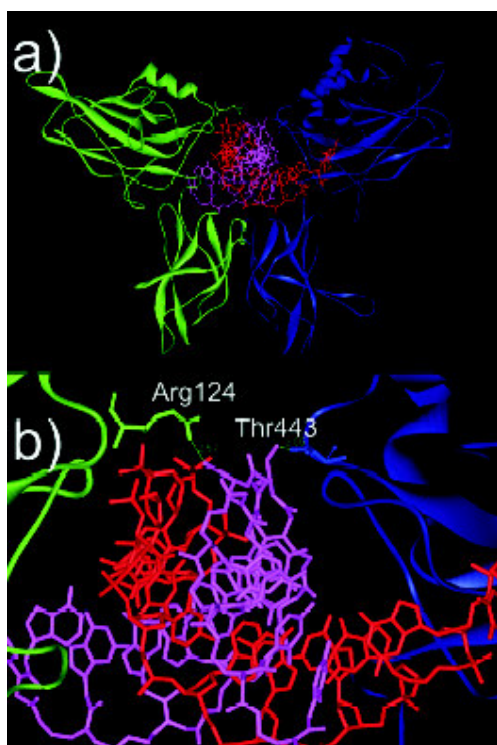


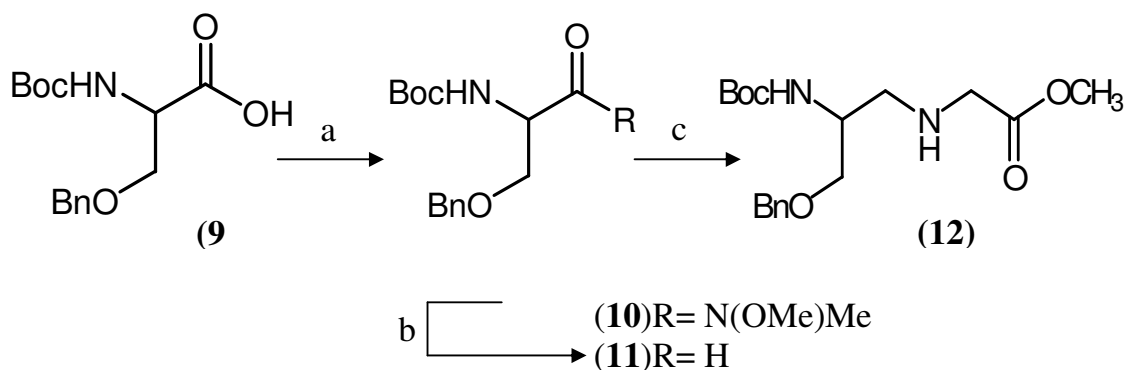
Fig. 2 *a)* Average structure of PNA/DNA duplex as obtained from molecular dynamic simulation of the complex between the transcription factor NF-kB and a PNA/DNA duplex with two consecutive PNA monomers replaced with ^LSer- γ PNA monomers. The PNA strand is represented in pink, the DNA strand in red. *b)* Details of the intramolecular H-bonds between the ^LSer- γ PNA side chains and some amino acid side chains of the transcription factor.

The MD analysis and comparison with the structure of the NF- κ B/DNA duplex complex underlined that in the complex formed by the Ser-modified PNA/DNA duplex and NF- κ B, there is a decrease in the number of hydrogen bonds for the PNA strand, while the base-specific interactions are partially preserved as reported for PNA/DNA complexes. However, the introduction of γ -Ser PNA monomers gives rise to intermolecular H-bonds with amino acid side chains of the transcription factor. This feature can be an important factor to increase the affinity of NF- κ B transcription factors and related proteins to PNA/DNA based molecules. γ -modified PNAs appear, thus, the most promising molecules. When the C γ is in the L configuration, in duplex the side chains point to the periphery of the hybrid. Derivatization of side chains even with bulky groups does not hamper hybrid formation. As the side chains are exposed, it is reasonable to think they might be modified with specific molecules for the targeting of determined sequences in determined cell compartments.

The synthesis of the serine-like PNA monomer started from commercially available Boc/Bn-serine (**9**) which was converted into the Weinreb amide (**10**). Reduction with lithium aluminium hydride furnished the corresponding aldehyde (**11**) in good yield. This aldehyde was used in a reductive amination reaction with glycine methyl ester hydrochloride to give the fully protected backbone (**12**) (scheme 3). The new backbone was then coupled to 1N-carboxymethylthymine (**6**) to give the fully protected PNA monomer (**13**). Deprotection of the ester (**13**) by treatment with sodium hydroxide, removal of Boc (**14**) and subsequently protection of the amino function with Fmoc (**15**) afforded the desired PNA monomer (**16**) (scheme 4).

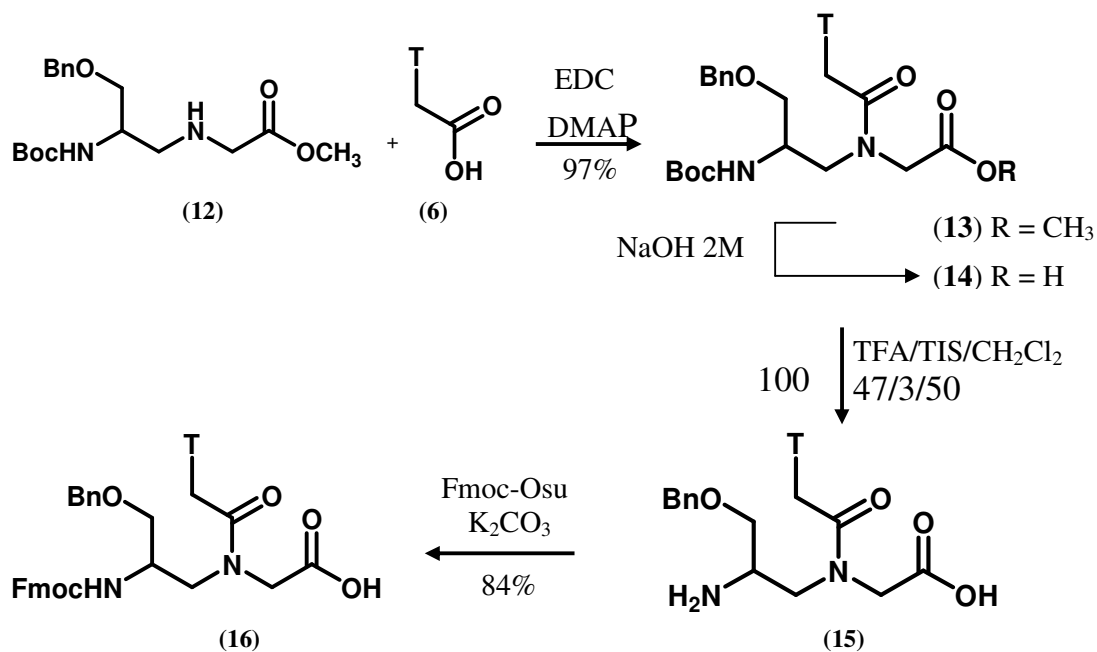
The serine-like PNA monomer will be employed as synthon for the preparation of new PNA oligomers with improved binding and solubility properties.

Scheme 3



Reagents and conditions: a) $\text{HCl} \cdot \text{HNMe}(\text{OMe})$, DMAP, TEA, EDC 98%; b) LiAlH_4 , THF 85%; c) $\text{NaB}(\text{OAc})_3\text{H}$, Gly-OMe, THF/DCE 1.5/1 55%.

Scheme 4



All products were characterized by NMR (^1H and ^{13}C) and mass spectrometry (ESI).